

Técnicas de selección espermática

María José Munuce^{1,2}, César Luis Berta^{1,3}

1) Reprolab-Biología de la Reproducción, Sanatorio Británico de Rosario. 2) Laboratorio de Estudios Reproductivos, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. 3) Servicio de Reproducción Humana y Planificación Familiar, Cátedra de Ginecología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.
Reproducción 2007;22:118-130

Resumen

Durante el tránsito de los espermatozoides por el tracto femenino tiene lugar un proceso activo de selección y sólo los mejores espermatozoides, llegan hasta el ovocito. En los tratamientos de reproducción asistida los espermatozoides son separados del plasma seminal, de las células y los leucocitos. Existen distintas técnicas de laboratorio para recuperar el mayor número de espermatozoides móviles y de buena morfología, las más utilizadas son: la centrifugación, la migración o swim up y los gradientes de densidad. En este trabajo nos disponemos a discutir las ventajas y desventajas de cada método en particular, así como también nuestra experiencia.

Sperm selection techniques

Summary

During sperm transit towards the female genital tract there is an active process of selection and only those sperm with better capacities, reach the oocyte. In assisted reproductive treatments plasma seminal, cellular components and leukocytes are removed from spermatozoa. There are several laboratory techniques to recover a large number of motile and morphological normal spermatozoa, the most used are: centrifugation, swim up and density gradients. In this study we will discuss the advantage and disadvantage of each one and also our experience.

Correspondencia: César Luis Berta
Reprolab-Biología de la Reproducción, Sanatorio Británico de Rosario.
E-mail: reprolab@ciynet.net.ar

Servicio de Reproducción Humana y Planificación Familiar, Cátedra de Ginecología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.
E-mail: cesarberta@hotmail.com

Introducción

El proceso de selección de espermatozoides *in vivo*

En los humanos luego de la eyaculación varios cientos de millones de espermatozoides son depositados en la vagina donde quedan atrapados. Entre los primeros 5 a 15 min, y gracias a la acción de las enzimas proteolíticas de origen prostático, el coágulo se digiere y los espermatozoides comienzan a escapar de la acidez vaginal (pH < 5) hacia el canal cervical.¹ A medida que ascienden por el tracto reproductivo femenino, los espermatozoides sufren una serie de cambios bioquímicos y funcionales, llamado capacitación, que los prepara para fecundar al ovocito.^{2,3} El plasma seminal es rico en factores que previenen que ocurra la capacitación por lo que una vez que los espermatozoides comienzan a liberarse de él comienzan a capacitarse.⁴ La primera barrera o filtro que opera *in vivo* para seleccionar y filtrar a los espermatozoides del plasma seminal es el moco cervical del canal cervical. Su estructura es la de un hidrogel compuesto por un sistema fibrilar de glicoproteínas que, mediante puentes disulfuro, une cadenas polipeptídicas paralelas formando una red o malla. Entre los intersticios se encuentra un componente soluble que contiene cloruro de sodio, proteínas, glucosa, manosa, aminoácidos y lípidos. La consistencia de este hidrogel varía con el contenido de estradiol y progesterona a lo largo del ciclo menstrual femenino, siendo máxima la penetrabilidad en el estadio periovulatorio.⁵

Durante el paso por el moco se seleccionan los espermatozoides de mejor forma y cinética

de desplazamiento. Los restantes anormales, así como detritus, bacterias y leucocitos, quedan retenidos en el moco y no ascienden a la cavidad uterina.^{6,7,8}

Consideraciones generales de procesamiento

En 1963 Yanagimachi y Chang⁹ lograron por primera vez fecundar ovocitos de hámster *in vitro* a partir de espermatozoides capacitados también *in vitro*, demostrando que la capacitación y la fecundación podían lograrse en forma artificial en el laboratorio. En los humanos, el primer nacimiento mediante FIV fue el de Louis Brown en 1978¹⁰ a partir de lo cual el desarrollo de técnicas de reproducción asistida ha sido vertiginoso. Hoy en día disponemos de numerosos procedimientos, los cuales incluyen las inseminaciones intrauterinas homólogas (IIU) o heteróloga (con semen de donante), la fecundación *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Si bien todas ellas requieren la selección de espermatozoides mediante un método rápido y seguro, en el caso de las IIU será necesario recuperar la mayor cantidad de espermatozoides funcionalmente aptos.

En líneas generales, las técnicas de selección de espermatozoides pueden dividirse en:

- a) Centrifugación
- b) Migración (*swim up*)
- c) Gradientes de densidad
- d) Filtración (*por lana de vidrio o bolitas de Sephadex*)

En esta revisión nos dedicaremos a discutir ventajas y desventajas de las tres primeras, por ser las más frecuentemente utilizadas.

Independientemente de cuál sea la técnica que elijamos para nuestras preparaciones en todos los casos necesitaremos disponer de algún medio de cultivo sintético que contenga una fuente de energía tal como el piruvato, lactato, glucosa, iones como el bicarbonato y calcio. Dentro de los medios más frecuentemente utilizados se encuentran el Ham F10,

Tyrode, Earle, Menezzo y el HTF (*de Human Tubal Fluid*), (ver tabla 1¹¹) que contiene bicarbonato o su versión modificada HTFm que contiene HEPES como *buffer*. Su versión modificada (HTFm) permite trabajar sin necesidad de disponer estufa de CO₂ ya que el *buffer* HEPES reemplaza al bicarbonato/CO₂ para regular el pH. Algunos autores han preferido usar alguna fuente proteica para captar el colesterol de la membrana espermática y acelerar el proceso de capacitación¹² tal como suero inactivado de la misma paciente, suero de cordón fetal o albúmina humana¹³. A nuestro entender el riesgo potencial de transmitir distintas enfermedades infecciosas (de origen humano u animal) hace riesgosa la utilización de este tipo de suplementos y no mejora sensiblemente los resultados.

Tabla 1. Composición química del Human Tubal Fluid (HTF).

Componente	mM
NaCl	101.6
KCl	4.69
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.20
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	2.04
NaHCO ₃	25
Glucosa	2.78
Piruvato de sodio	0.33
Lactato de sodio	21.4
Penicilina	100 U/ml
Sulfato de estreptomina	50 µg/ml
Rojo fenol	0.001 %

Tanto los espermatozoides anormales como los leucocitos producen especies reactivas de oxígeno responsables de la peroxidación lipídica de la membrana plasmática que lleva a la pérdida de la función espermática. Una vez libres del plasma seminal y su batería antioxidante (vitamina C y E, superóxido dismutasa, glutatión), los espermatozoides son extremadamente sensibles al daño oxidativo.^{14,15} Algunos autores han propuesto el agregado de sustancias antioxidantes durante la preparación *in vitro* de los espermatozoides.¹⁶ Nosotros no

hemos visto que el agregado de alfa-tocoferol durante la selección espermática prevenga sensiblemente la magnitud de la lipoperoxidación lipídica ante el agregado de sustancias oxidantes.^{17, 18}

Un punto fundamental a la hora de realizar una técnica de selección de espermatozoides es el tiempo y la temperatura de manipulación de la muestra. Esto que parecería ser una cuestión obvia, a veces no resulta así. Tenemos que tener en cuenta que cuanto más rápido los espermatozoides eyaculados sean liberados del plasma seminal, mejores resultados obtendremos. Esto ha sido profundamente estudiado por Yavas y Selub¹⁹ quienes publicaron recientemente que la permanencia de los espermatozoides en el plasma seminal por más de 30 min disminuye significativamente las chances de lograr un embarazo por IIU. Más aún, demostraron que el procesamiento de selección de los mismos no puede demorar más de 60 min. En líneas generales sugerimos que desde la obtención de la muestra de semen hasta la transferencia de los espermatozoides a la cavidad uterina tendríamos un tiempo máximo de 90 min. En nuestro Servicio, cuando se trata de IIU, alentamos la obtención de la muestra dentro de nuestras instalaciones en un ambiente templado para disminuir el tiempo de transporte y asegurarnos de que la muestra se licúe a 37°C. Sabemos que la primera fracción del eyaculado es la rica en espermatozoides y fluido prostático, por lo que es de esperar que *in vivo* los espermatozoides se mezclen con el moco cervical antes que con las restantes fracciones provenientes de las glándulas anexas. Es por ello que Bjorndahl y Kvist,²⁰ proponen la obtención de muestras en *split* o en fracciones (hasta 6), donde la primera fracción sea utilizada para la técnica de selección antes de que tome contacto con el resto de las fracciones. Si bien la hipótesis del fraccionamiento espermático suena fisiológicamente correcta, en la práctica diaria requeriría de un esfuerzo extra del paciente

para realizar la toma fraccionada. Esto puede reemplazarse por el procesamiento inmediato de la muestra una vez licuada.

¿Cuál sería el mejoramiento ideal?

La preparación ideal debería ser aquella que permitiese extraer del eyaculado original la mayor cantidad de espermatozoides móviles de buena morfología, libres de células inflamatorias, espermatozoides muertos o anormales y principalmente, libres de plasma seminal.²¹ Usualmente se cuantifica la cantidad de espermatozoides progresivos recuperados, ya que los no progresivos no son funcionalmente útiles para IIU (sí lo son en el caso de ICSI).

Tasa de recuperación de espermatozoides progresivos (TRP):

$$(V \times C \times \% \text{ progresivos}) \text{ final} / (V \times C \times \% \text{ progresivos}) \text{ inicial} \times 100$$

Final: es post-mejoramiento

Inicial: semen basal

V: el volumen

C: la concentración de espermatozoides

% de progresivos: % de espermatozoides Grado II+III (a + b).

Este número puede variar de 0 % (la peor situación donde no hay recuperación) al 100 % (donde idealmente se han extraído todos los espermatozoides móviles del eyaculado).²² También podemos evaluar cuántas veces se concentra la muestra respecto de la situación inicial calculando la magnitud de la concentración: $(C \times \% \text{ progresivos}) \text{ final} / (C \times \% \text{ progresivos}) \text{ inicial}$.

Técnicas más frecuentemente utilizadas:

Centrifugación

Esta fue la primera forma de concentrar espermatozoides y eliminar el plasma seminal con la cual se consiguieron los primeros embarazos en FIV,¹⁰ la cual es aún utilizada en