

algunos laboratorios.²³ Se la llamó lavado o *washing* ya que los espermatozoides solamente eran centrifugados o lavados del plasma seminal.

Técnica: el plasma seminal se remueve diluyendo el semen en una relación 1:6 a 1:10 con medio de cultivo tibio. La mezcla es centrifugada 10 minutos a 300 G. Se elimina el sobrenadante y se recupera el *pellet* ajustándose el volumen a 0.3-0.5 ml. Puede repetirse el lavado.

Ventaja: consigue concentrar espermatozoides brindando una tasa de recuperación de espermatozoides cercana al 75 %.²³ Se elimina el plasma seminal de un modo sencillo, rápido, económico sin necesidad de estufa de cultivo ni soluciones de gradiente.

Desventaja: no selecciona poblaciones de mejor calidad ni elimina detritus, células ni leucocitos, sino que por el contrario las concentra junto a los espermatozoides. Se ha demostrado que la centrifugación induce daño subletal sobre el espermatozoide^{24, 25} ya que libres de plasma seminal y su protección antioxidante, son muy vulnerables a la acción de las especies reactivas del oxígeno generadas por los leucocitos y espermatozoides anómalos, lo que induce daño en las membranas.^{14, 15} En líneas generales ya no se recomienda su utilización.

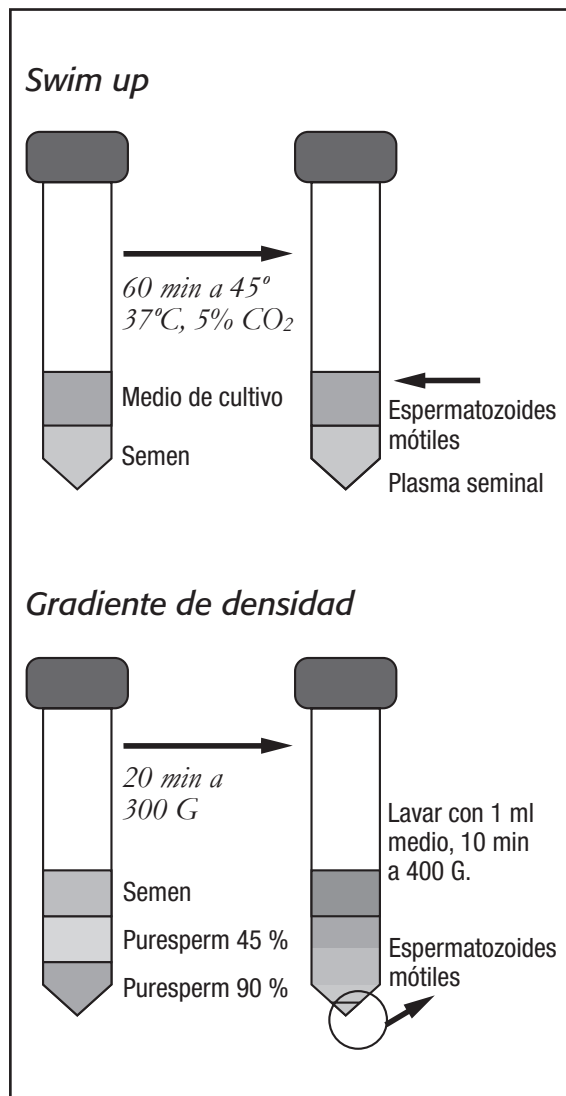
Swim up

Consiste en dejar que los espermatozoides móviles migren hacia la superficie de un medio de cultivo, liberándose así del plasma seminal.^{26, 27}

Técnica: en el fondo de un tubo se dispone una capa de semen y por encima otra de medio de cultivo en relación 1:1 (ej. 0.5 semen: 0.5 medio) y se incuba durante 1 h a 37 °C en ángulo de 45 ° para favorecer la superficie de contacto (figura 1). Con pipeta Pasteur se recupera la capa superior donde están los espermatozoides móviles. Para prevenir el daño por la centrifugación inicial se propone utilizar varios tubos paralelos de *swim up*, y luego cen-

trifugar las fracciones sobrenadantes. El hecho de que los espermatozoides inmersos en un medio hiperosmolar como el plasma seminal (337 a 457 mOsm/l) deban nadar a un medio de cultivo hipoosmolar (280 mOsm/l) implica que pueda existir movimiento de agua hacia dentro de la célula, lo que llevaría al hinchamiento (aumento de volumen) y pérdida del movimiento de espermatozoide.²⁸ Se sugiere que la incubación dure al menos 30 a 60 min para que el espermatozoide pueda reajustar su volumen.²⁰

Figura 1. Esquema de las técnicas más frecuentemente empleadas para la selección de espermatozoides móviles: *Swim up* y Gradiente de densidad.



Ventaja: es una técnica sencilla, económica y con buenos rendimientos en pacientes de buena concentración. Sólo ascienden los espermatozoides móviles que generalmente tienen muy buena morfología. Está especialmente indicada para procedimientos de FIV donde se necesita una concentración baja de espermatozoides (50.000 a 100.000 esp móviles post-recuperación). En el caso de IIU, donde al menos se necesitan algunos millones de espermatozoides progresivos, se recomienda largar más de un tubo para maximizar la obtención de una cantidad suficiente. Es sin dudas la técnica más recomendable en el caso de pequeños laboratorios que no cuenten con un gran flujo de pacientes ya que los medios de cultivo pueden alicuotarse en esterilidad y ser conservados en pequeñas alicuotas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongelarse el día del procedimiento.

Desventaja: las concentraciones recuperadas son bajas especialmente en casos de oligoastenozoospermia comparadas con las sugeridas para IIU. La TRP resulta ser del 8 al 10 %. Se ha demostrado la presencia de restos de plasma seminal adheridos a los espermatozoides post *swim up*²⁹ y esta contaminación podría inhibir la ocurrencia de la reacción acrosomal sobre la zona pelúcida del ovocito disminuyendo las chances de fecundación.

Swim up o migración por ácido hialurónico

La técnica de *swim up* resultaría equivalente al paso de los espermatozoides a través del moco cervical. Sin embargo, las propiedades reológicas del moco periovulatorio son bien diferentes a las del medio de cultivo. Por ello se propuso la utilización del ácido hialurónico en su forma salina de sodio, comercialmente llamado *Sperm Select System (Select Medical Systems)*, el cual mimetiza al moco ya que resulta ser un polisacárido viscoso de alto peso molecular que forma una trama o malla.³⁰

Técnica: el producto viene fraccionado en pequeñas ampollas de hialuronato de sodio (10 mg/ml) y un medio tamponado. Con la ayuda de una jeringa de tuberculina se agregan

0,5 ml de Sperm Select al vial de buffer. Por debajo se deposita 1 ml de semen y se incuba 45 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego se recupera la capa de 0.5 ml de la superficie que contiene los espermatozoides móviles y se insemina.

Ventaja: se recuperan espermatozoides muy móviles con membranas intactas debido a la ausencia de centrifugación.^{31, 32} Resulta un buen método para eliminar bacterias.³³ Cuando se compara la eficiencia de recuperación vs el *swim up* resulta significativamente diferente (17.7 vs 8.6 % $p < 0.01$) sin que esto resulte en mayores tasas de embarazo.³⁴ Especialmente útil para ginecólogos residentes en lugares sin laboratorios adecuados ya que las ampollas se guardan en la heladera (a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) y pueden procesarse en forma sencilla en el consultorio.

Desventaja: tal como ocurre con el *swim up* resulta ser baja la TRP en pacientes oligoastenozoospermicos que requieren IIU. Es necesario disponer de ácido hialurónico de gran pureza (lo cual puede ser costoso) o recurrir a preparaciones comerciales.

Gradiente de densidad

Consiste en hacer que los espermatozoides móviles y morfológicamente normales atraviesen un gradiente discontinuo de partículas coloidales de silica (a modo de red) ayudados por la fuerza de su propia propulsión y la centrifugación. De esta forma se liberan del plasma seminal y las células y se concentra en espermatozoides móviles morfológicamente normales.³⁵

Inicialmente se utilizó el Percoll (Pharmacia Biotech), partículas de silica recubiertas de polivinilpirrolidona (PVP). Luego se cuestionó la esterilidad del producto y la posibilidad de que las partículas fueran irritantes a los tejidos cuando se utilizaba para IIU.³⁶ A partir de octubre de 1996 luego de un agitado debate (para más detalles ver 37) se decidió prohibir la utilización del Percoll para uso humano por no estar aprobado por la FDA limitando su uso sólo para experimentación *in vitro*. En su reemplazo se comenzó a comercializar una preparación de partícula-

las coloidales de silica pero recubiertas con silane, en un medio isotónico tamponado, el cual ha mostrado bajos niveles de endotoxinas (<1.0E U/ml). La efectividad en la selección de espermatozoides de estas nuevas formulaciones resultó comparable a la del Percoll, si bien el precio trepó de 2 y 3 veces.^{38, 39}

En el mercado existen distintas marcas tales como Isolate (Irvine Sc. Co.), SpermFilter (Cryos), Puresperm (Nidacon), Silselect (FertiPro), IxaPrep (Medicult), todas de muy buena calidad y de fácil uso.

Técnica

A diferencia de lo que ocurría con el Percoll donde se preparaba la solución *stock* isotónica con medio Ham F10 (10x), las nuevas formulaciones ya son de por sí isotónicas (300 ± 10 mOsm/l) y sólo requieren que se las diluya con medio de cultivo para formar los distintos gradientes. Algunas empresas también comercializan los distintos gradientes listos para usar. Se utilizan diversas relaciones, donde las más utilizadas son 90 %-45 % u 80%-40 % (figura 1). En cuanto al volumen de las capas, esto depende de las características de la muestra basal, pero generalmente se utilizan capas de 1 ml cada una o de 0,5 ml en el caso de oligoastenozoospermias. Se centrifuga 300 G durante 20 minutos, luego de lo cual eliminamos las primeras capas que contienen las células, los espermatozoides muertos o inmóviles y el plasma seminal. Es importante que este *pellet sea* flojo y no compacto, cosa que se consigue ajustando la velocidad de la centrífuga, como se describe abajo. Se resuspende el *pellet* y se lava centrifugando 10 minutos a 400 G con 1-2 ml de medio tibio y se descarta el medio sobrenadante ajustando el volumen a 0.3-0.5 ml para inseminar. Luego de la selección, siempre debe analizarse la concentración y la motilidad basal para poder calcular la tasa de TRP.

¿Cómo calcular la velocidad de centrifugación?

$$\text{rpm} = \sqrt{[g / (1.118 \times r)]}$$

g: fuerza centrífuga máxima que va a experimentar el fondo del tubo.

rpm: revoluciones por minuto (en miles).

r: radio rotacional de la centrífuga en mm.

Para llegar a 300 g con un radio de centrifuga de 165 mm la velocidad de la centrífuga en rpm debe ser:

$$\text{rpm} = \sqrt{300 / (1.118 \times 165)} = 1.275 \times 10^3 \text{ rpm (1275 rpm)}$$

Gradientes hiperosmolares

Considerando que el plasma seminal tiene una osmolaridad que aumenta con el tiempo de licuefacción⁴⁰ llegando a valores entre 337 a 457 mOsm/l,⁴¹ algunos autores propusieron que si los espermatozoides atravesaban un gradiente hipoosmolar podían resultar hinchados como consecuencia del ingreso de agua para equilibrar la osmolaridad y no alcanzarían las capas más densas del gradiente hasta tanto no hubieran equilibrado su volumen. Por lo tanto, propusieron la utilización de capas inferiores hiperosmolares (361 to 365 mOsm/l) reportando mejores TRP y sin modificaciones en el volumen.^{42, 43} Una solución sería utilizar los gradientes comerciales pero prolongar en tiempo de centrifugación a 30 a 45 min. (en vez de los 20 min) para permitir al espermatozoide ajustar el desbalance osmótico.²⁰

Ventaja generales de los gradientes

En líneas generales la utilización de gradientes de densidad rinde buenas concentraciones de espermatozoides móviles, aún en caso de pacientes oligo-astenozoospermicos, de buena morfología (figura 2a); buen empaquetamiento del ADN y acrosoma intacto y con buena capacidad fecundante.^{44, 24, 45, 46, 47, 48, 49} Además, los espermatozoides son centrifuga-