

Técnicas para la preparación de semen en reproducción asistida

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular
Comité Científico
Comisión de Seminología y Técnicas de Reproducción Asistida
Documento C. Fase 3. Versión 4

Preparado por:

I. Sánchez, C. Mar, JA. Castilla, M. Marcos, I. Martín, A. Galán, MI. Jiménez, JM. Moreno, MG. Serrano, I. García-Cobaleda, C. Aulesa, V. Lozano, C Sánchez, J de Montserrat

ÍNDICE

1. Introducción
2. Objeto y campo de aplicación
3. Bases fisiológicas de la capacitación del espermatozoide
4. Objetivo de las técnicas de preparación de semen
5. Preparación del semen
 - 5.1. Materiales y medios necesarios:
 - 5.2. Métodos de preparación del semen:
 - 5.2.1. Migración
 - 5.2.2. Gradientes de densidad
 - 5.3. Muestra
 - 5.3.1. Semen fresco
 - 5.3.2. Semen congelado
 - 5.4. Resultados
6. Recomendaciones
7. Conclusiones
8. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN

La preparación de los espermatozoides es un requisito previo para la realización de cualquier técnica de reproducción asistida, incluyendo la inseminación artificial. Persigue dos objetivos:

1. Eliminar el plasma seminal que contiene sustancias inhibitoras de la capacitación, prostaglandinas, agentes infecciosos y proteínas antigénicas.
2. Separar los espermatozoides móviles de los inmóviles, de los leucocitos, de las células germinales inmaduras y de otras células redondas.

La finalidad de este proceso es seleccionar los espermatozoides móviles morfológicamente normales y mejorar la calidad de los mismos, porque disminuye la liberación de linfoquinas y reduce la formación de radicales libres (1). El resultado de la preparación, junto con otros factores dependientes de la mujer, determinará la técnica de reproducción asistida a aplicar en cada caso (2).

El adecuado procesamiento de la muestra va a influir en la capacidad fecundante del espermatozoide, tanto *in vivo* como *in vitro* y será fundamental para el éxito de la reproducción asistida (3,4).

2. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Los laboratorios clínicos, en respuesta a la creciente necesidad, deben ofrecer en su cartera de servicios técnicas de preparación de semen para reproducción asistida.

El objeto de este documento es establecer unas recomendaciones para la realización de las técnicas de recuperación de espermatozoides móviles.

El campo de aplicación de esta técnica es:

1. Diagnóstico, en el estudio básico de la pareja estéril.
2. Tratamiento, preparación del semen para la técnica de reproducción asistida de elección.
3. Selección de espermatozoides para pruebas funcionales.

3. BASES FISIOLÓGICAS DE LA CAPACITACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

Los espermatozoides de todos los mamíferos placentarios son incapaces de fecundar el ovocito directamente desde el eyaculado, y deben experimentar un proceso en el que se producen cambios moleculares denominados capacitación. Los espermatozoides adquieren la capacidad de fecundar el ovocito después de haber permanecido durante un tiempo en el tracto genital femenino.

Actualmente no se conocen todos los sucesos implicados en el complejo proceso de la capacitación. Se diferencian las siguientes etapas (5,6):

1. Fluidificación de la membrana celular debido a modificaciones de la estructura lipídica.
2. Flujo de Ca^{++} hacia la cabeza y flagelo del espermatozoide.
3. Generación de cantidades controladas de especies reactivas de oxígeno
4. Fosforilación de proteínas en los residuos de serina, treonina y tirosina.

La modificación de los esteroides de la membrana plasmática del espermatozoide se inicia tras la retirada del plasma seminal (7). Sustancias captadoras como la albúmina localizadas en el moco cervical actuarían facilitando los cambios en el componente lipídico de la membrana del espermatozoide (8).

En condiciones *in vivo* los espermatozoides móviles se separan del resto del eyaculado por migración activa a través del moco cervical. La capacitación de los espermatozoides se puede conseguir *in vitro*, si son sometidos durante el tiempo necesario, a unas condiciones de cultivo que faciliten y aporten los cambios y las señales de transducción de forma semejante a las condiciones *in vivo* (8).

La capacitación es un fenómeno reversible necesario para la inducción del movimiento hiperactivo, la capacidad de interactuar con la zona pelúcida, la reacción acrosómica y el inicio de la fusión con el ovocito (5).

4. OBJETIVOS DE LAS TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE SEMEN

El plasma seminal puede contener agentes infecciosos que deben eliminarse antes de cualquier técnica de reproducción asistida, ya que

son susceptibles de provocar infecciones en la mujer y contaminar los cultivos de ovocitos y embriones (9).

El contacto durante un tiempo prolongado de los espermatozoides con el plasma seminal produce un efecto adverso, puede impedir de forma permanente la fecundación. Así la separación de los espermatozoides del plasma seminal debe realizarse lo más rápido y eficazmente posible (3,10).

Por lo tanto los objetivos de las técnicas de preparación de semen serán:

1. Separar los espermatozoides del plasma seminal que contiene sustancias decapacitantes, prostaglandinas y linfoquinas.
2. Retirar los espermatozoides muertos, leucocitos, células redondas y agentes infecciosos.
3. Aportar un medio de cultivo que contenga moléculas captadoras de esteroides (albúmina) y una composición iónica que apoye la homeostasis del espermatozoide y facilite las señales de transducción (calcio, bicarbonato) (8).

5. PREPARACIÓN DEL SEMEN

5.1 Materiales y medios necesarios

Todos los materiales empleados así como los medios de cultivo deben ser estériles y manejarse en condiciones de asepsia, en campana de flujo laminar. Los medios de cultivo han de atemperarse antes de su uso y tener la certificación CE.

Los medios de cultivo deben tener una osmolalidad entre 280-300 mOsm/kg. El pH debe mantenerse en un rango entre 7.2-7.4, para ello es necesario utilizar medios tamponados. Los tampones más utilizados son: HEPES, fosfato o bicarbonato. Los medios tamponados con bicarbonato necesitan una atmósfera rica en CO₂ y una temperatura de 37°C para que se mantenga el equilibrio iónico, por lo que tienen que usarse en estufa con temperatura y CO₂ controlados.

Además los medios deben tener una concentración de calcio, bicarbonato y proteínas específica para que los espermatozoides adquieran la capacidad de fecundar.

Los medios para la preparación de semen son de dos tipos:

1. Medios para preparación de gradientes.

Los más usados contienen una suspensión coloidal de partículas de sílice unidas de forma covalente a moléculas de silano y se preparan en solución isotónica.

2. Medios de lavado y cultivo.

Se recomienda utilizar medios que no requieran CO₂, porque la mayor parte del proceso se realiza en atmósfera aire. Los medios específicos para semen suelen estar tamponados con HEPES y pueden usarse en atmósfera aérea. Contienen proteínas, mayoritariamente albúmina que actúa como captadora y transportadora de moléculas, así como la concentración de sales necesaria para la homeostasis del espermatozoide y en la mayoría de los casos gentamicina como agente bacteriostático.

5.2 Métodos de preparación del semen

Los métodos incluyen desde la simple dilución y centrifugación hasta técnicas más complicadas.

1. Dilución y lavado del semen
2. Migración
3. Gradientes de densidad
4. Adherencia-Filtración
5. Métodos avanzados: anticuerpos monoclonales, tecnología de microesferas (anexina V magnetic-activated cell sorting), electroforesis, ácido hialurónico, dextrano...

Los métodos que utilizan solo lavado, deberían abandonarse y emplear técnicas más seguras de preparación de espermatozoides (4). Para los métodos de migración el movimiento del espermatozoide es un requisito esencial. En los métodos de adherencia-filtración, es necesaria la combinación de la movilidad de los espermatozoides con la adherencia a las matrices de filtración (lana de vidrio, sefadex) (11). Los gradientes de densidad separan los espermatozoides en función de su punto isopícnico. Los métodos avanzados se desarrollan para investigación.

De todos los métodos, los que realmente tienen utilidad clínica son los de migración y gradientes de densidad, el resto no se exponen en el documento.

5.2.1 Migración

Se basan en la capacidad de movimiento de los espermatozoides, de migrar desde el semen al medio cultivo. Dentro de esta categoría existen dos formas principales *Swim Up* directo y *Swim Up* convencional.

5.2.1.1 SWIM UP DIRECTO

El semen licuado se deposita debajo o sobre un medio de cultivo y los espermatozoides con buena movilidad se dirigen al medio de cultivo de forma semejante al proceso *in vivo* a través del moco cervical.

El proceso consta de varias fases:

1. Colocar aproximadamente 250 µL de semen licuado en el fondo de un tubo no cónico (para aumentar la superficie de contacto). Utilizar tantos tubos como sea necesario para mejorar la recuperación de los espermatozoides.

2. Depositar sobre el semen 500 µL de medio de cultivo resbalando por las paredes del tubo, con cuidado de que no se mezcle con el semen.

3. Dejar en un incubador a 37°C formando un ángulo de 45°, para aumentar la interfase, durante un tiempo entre 30-60 minutos dependiendo de la calidad del semen. No más tiempo para evitar la contaminación con plasma seminal (10)

4. Pasado este tiempo aspirar aproximadamente 300 µL de medio de cultivo, con cuidado de no aspirar semen (para lo cual durante todo el proceso se debe mantener el ángulo del tubo). Si hay más de un tubo de una misma muestra se unifica todo el aspirado en un único tubo.

5. Si el volumen obtenido es mayor de 500 µL, valorar el grado de movilidad y la concentración de los espermatozoides. Centrifugar y llevar a un volumen final de 300-500 µL para inseminar.

5.2.1.2 SWIM UP CONVENCIONAL

Se basa en el mismo principio pero requiere un primer paso de lavado

1. Añadir medio de lavado en una proporción v/v, homogeneizar.

2. Centrifugar durante 10 minutos a 500 g. Se recomienda una centrífuga de cabezal fijo para que el botón celular tenga una amplia superficie de contacto con el medio de cultivo.

3. Retirar el sobrenadante con cuidado de no aspirar el botón celular.

4. Añadir resbalando lentamente por las paredes del tubo 500 µL de medio de lavado.

Continuar el proceso desde el punto 3 del método anterior.

El inconveniente de estos métodos es que los espermatozoides inmaduros y el resto de las células permanecen en contacto durante todo el proceso con los espermatozoides maduros y pueden producir efectos adversos sobre estos. Además muchos de los espermatozoides móviles pueden quedar atrapados en el fondo del sedimento y no alcanzar nunca el medio de cultivo (4). La ventaja respecto del método anterior es que disminuye la contaminación con el plasma seminal (10).

Para mejorar la tasa de recuperación de espermatozoides móviles se puede fraccionar la muestra en varios tubos, procesarlos siguiendo el protocolo y unificar el aspirado de cada tubo en un único tubo. Se debe valorar y si es necesario, se centrifugará y resuspenderá en un volumen entre 300-500 µL de medio de cultivo para inseminar.

5.2.2 Gradientes de densidad

Los gradientes de densidad disgregan las partículas en función de su densidad de flotación. Los diferentes componentes se separan hasta alcanzar una posición en la que su densidad sea igual a la de su entorno (situación de flotabilidad neutra), donde ya no se desplaza más. Los espermatozoides maduros son células compactadas y alcanzan el gradiente de mayor densidad (el fondo del tubo). El plasma seminal permanece flotando sobre el gradiente de menor densidad y las células, los espermatozoides inmaduros y muertos se sitúan en la interfase entre los dos gradientes.

Los gradientes de densidad utilizados actualmente parten de una suspensión coloidal de partículas de sílice unidas de forma covalente a moléculas de silano, se utilizan de forma discontinua en soluciones isotónicas a una concentración del 80 y del 40% y pueden adquirirse ya preparadas.

Se recomienda utilizar volúmenes de 0,5-1 mL de cada gradiente de concentración. Se preparan los tubos que sean necesarios por muestra teniendo en cuenta que no se debe depositar más de 1,5 mL de semen por tubo.

1. Dispensar 0,5 mL del gradiente de 40% en un tubo cónico, a continuación con una jeringa de 1 mL conectada a una aguja larga de carga, depositar 0,5 mL del gradiente de 80% en el fondo del tubo (cono), muy despacio para que el gradiente de 40% suba y queden bien definidas las dos capas.

2. Decantar el semen licuado, resbalando por las paredes de los tubos, con cuidado de no romper la interfase. El semen debe quedar encima del gradiente de 40%.

3. Centrifugar a 300 g durante 20 minutos.

4. Aspirar las distintas capas con una pipeta pasteur en la zona del menisco para evitar alterar las interfases y las posibles contaminaciones, hasta alcanzar claramente el gradiente de 80%, donde se encuentra el sedimento con los espermatozoides maduros. Repetir el proceso con todos los tubos de la misma muestra.

5. Cambiar de pipeta, al aspirar el/los sedimentos. Transferir a un único tubo nuevo (para evitar contaminaciones) con 1-2 mL de medio de lavado, homogeneizar y centrifugar a 500 g durante 10 min.

6. Retirar todo el sobrenadante, con cuidado de no aspirar el botón celular.

7. Resuspender en 300-500 µL de medio de cultivo.

5.3 Muestra

5.3.1 Semen fresco

La muestra de semen debe recogerse siguiendo las recomendaciones de la fase preanalítica previamente publicadas (12).

Pasados 30 minutos de la eyaculación separar una alícuota de semen para su valoración siguiendo las recomendaciones de la ESHRE (13).

5.3.2 Semen congelado

En aquellas situaciones en las que no se puede emplear semen fresco se puede recurrir a semen congelado. Existen dos tipos de muestras de semen criopreservadas:

- Semen criopreservado antes de iniciar terapias que pueden comprometer la capacidad reproductora del paciente, cuando exista dificultad para conseguir coordinar el momento de la inseminación con la recogida del semen, parejas serodiscordantes, etc.

- Semen de donante. En determinadas circunstancias como son oligozoospermias severas, ausencia de espermatozoides en testículo, enfermedades hereditarias en las que el varón es el portador y mujeres sin pareja masculina.

La muestra de semen criopreservada contiene un agente crioprotector que debe ser retirado antes de utilizarla para cualquier técnica de reproducción asistida.

La forma habitual para descongelar el semen es dejar las pajuelas de seguridad biológica a temperatura ambiente durante 10 minutos.

1. Decantar el contenido de las pajuelas en un tubo estéril.

2. Diluir (aproximadamente a 1/5) en medio de lavado. La dilución debe ser un proceso lento para evitar el choque osmótico (14). Se añaden lentamente, homogeneizando, durante al menos 10 minutos (gota a gota) 4,5 mL de medio de lavado, para que se produzca el equilibrio osmótico sin daño para el espermatozoide.

3. Procesar igual que el semen fresco, preferiblemente por gradientes de densidad.

Una vez descongelado el semen y antes de procesarlo debe valorarse la concentración y el grado de movilidad de los espermatozoides.

5.4 Resultados

Una vez terminada la técnica hay que calcular el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y realizar el recuento de los mismos siguiendo las directrices de la ESHRE (13).

Los resultados se obtienen multiplicando el tanto por ciento de espermatozoides con movilidad progresiva, por los millones de espermatozoides recuperados y por el volumen final. Se expresará como millones de espermatozoides recuperados con movilidad progresiva. Si el semen se va a utilizar para inseminación artificial se informará como millones inseminados y se calcularán multiplicando por el volumen inseminado.

En caso de utilizar parte del volumen eyaculado, los resultados deben expresarse en función del volumen utilizado, y multiplicarse por el factor de corrección.

La relación del total de espermatozoides presentes en el eyaculado con el número de espermatozoides móviles recuperados, se expresa como porcentaje de recuperación (4) y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \left[\frac{(\text{VF} \times \text{CF} \times \text{REM})}{(\text{VU} \times \text{CI} \times \text{IEM})} \right] \times 100$$

VF= volumen final

CF= concentración final de espermatozoides

REM= tasa de espermatozoides con movilidad progresiva recuperados

VU= volumen semen utilizado

CI= concentración inicial de espermatozoides

IEM=tasa de espermatozoides con movilidad progresiva en el eyaculado

6. RECOMENDACIONES

Para el correcto desarrollo de este proceso se debe tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Utilizar siempre material estéril.
- Deben utilizarse pipetas Pasteur en lugar de agujas para aspirar espermatozoides.
- La preparación del semen debe comenzar no más tarde de 30 minutos de la eyaculación, ya que la capacidad de fecundar el ovocito puede verse afectada.
- Aspirar siempre las diferentes fases en la zona del menisco para no alterarlas.
- No mezclar plasma seminal con los espermatozoides recuperados, puede impedir la capacitación.
- Si el semen preparado va ser utilizado para inseminación artificial, deberá usarse lo antes posible.
- Diluir muy lentamente el semen descongelado.
- Centrifugar siempre a los g recomendados.

Cálculo de los g de una centrifuga:

$$g = 0.0000112 \times r \times N^2$$

g= fuerza centrifuga en el fondo del tubo

r= radio de la centrifuga en cm

N= revoluciones /minuto

7. CONCLUSIONES

El papel de los parámetros seminales como factor pronóstico en la fertilidad masculina está actualmente sometido a debate (2,15,16). Se ha propuesto el test de recuperación de espermatozoides móviles (REM) en el estudio de la pareja estéril como prueba para distinguir que parejas se beneficiarán de la inseminación artificial y cuales no, porque incluye la concentración, la movilidad así como los efectos del procesamiento de los espermatozoides (17,18).

Es difícil establecer un número mínimo de espermatozoides recuperados para realizar inseminaciones intraútero y obtener una tasa de gestación adecuada. Los niveles umbral en los distintos trabajos oscilan desde 0.8 a 5 millones. No se ha podido identificar un umbral óptimo de REM que permita aconsejar a las parejas. Se requieren estudios adicionales para evaluar la capacidad predictiva del REM en los estudios de fertilidad (19). Algunos autores proponen que cada centro establezca su punto de corte en función de datos clínicos y de laboratorio de cada centro (17,18).

Una revisión Cochrane sobre las diferentes técnicas de preparación de semen concluye (20):

1. En cuanto a resultados clínicos (tasa de embarazo/tasa de recién nacidos vivos). No hay evidencia científica suficiente para recomendar una técnica de preparación de semen, al considerar resultados de los ensayos cuasialeatorios, la técnica de gradientes de densidad puede parecer mejor, pero necesita confirmarse con ensayos clínicos aleatorios.

2. Respecto a los parámetros seminales tras la preparación de semen. La técnica de gradientes parece mejor en cuanto a concentración de espermatozoides y a tasa de recuperación de espermatozoides móviles, mientras que la técnica de *swim up* recupera los espermatozoides con mejor movilidad, y en cuanto a la morfología no se encontraron preferencias. En términos generales la técnica de gradientes puede parecer superior, aunque debe confirmarse con ensayos clínicos de calidad

Debido a que no existe una conclusión definitiva para definir que característica del semen puede predecir la capacidad de fecundar, algunos autores proponen el uso de pruebas adicionales de función

espermática en el estudio de infertilidad, capaces de predecir el embarazo con alta especificidad y valor predictivo positivo en parejas con subfertilidad masculina (reacción acrosómica, unión a la zona pelúcida HZA) (1,19,21).

8. BIBLIOGRAFIA

1. Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E, et al. Semen quality and intrauterine insemination. *Reproductive BioMedicine Online* 2003; 4:485-92.
2. Wainer R, Albert M, Dorion A, et al. Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intruterine insemination. *Human. Reprod.* 2004; 19: 2060-5.
3. Rogers BJ, Perreault SD, Bentwood BJ, Variability in the human-hamster in vitro assay for fertility evaluation *Fertil Steril.* 1983; 39:204-11.
4. Mortimer D. Sperm preparation methods. *J. Androl* 2000; 21:357-66.
5. Naz R, Rajesh P. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosma reaction *Reproductive Biology Endocrinology* 2004; 2:75.
6. De Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Biochem. Biophys Acta* 2008, 1784:106-15
7. Cross N. Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biol Reprod* 2003; 69:529-34.
8. De Jonge C. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 2005;11:205-14
9. Nicholson CM, Abramsson L, Holm SE, Bjurulf E. Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient-centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces. *Human Reprod* 2000; 15:662-6.
10. Björndahl L, Mohammadi M, Pourian M, et al. Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *J Androl* 2005; 26: 170-3.
11. Henkel R, Schill W. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endo* 2003; 1:108.
12. Aulesa C, Mar C. Recomendaciones en la fase preanalítica para el análisis del semen. *Quím Clín* 2006; 25:416-8.
13. Kvist, U. and Björndahl, L. (eds), (2002) ESHRE Monographs: Manual on Basic Semen Analysis. Oxford University Press, Oxford, UK.
14. Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reproductive BioMedicine Online* 2004; 9:134-51.
15. Ombelet W, Bosman E, Janssen M, et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing *Human Reprod* 1997; 12: 987-93.
16. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001; 345:388-93.
17. Duran HE, Morshedi M, Kruger T, Oehninger S. Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. *Human Reprod Update* 2002; 8:373-84.
18. Van Weert J, Repping S, van Voorhis B, et al. Performance of the post wash total motile sperm count as a predictor of pregnancy at the time of the intrauterine insemination: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2004; 82:612-20.
19. Bendsdorp AJ, Cohlen BJ, Heineman MJ, et al. Inseminación intrauterina para la subfertilidad masculina (Revisión Cochrane traducida). En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2007 Número 4. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de The Cochrane Library, 2007 Issue 4. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
20. Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, et al. Técnicas de preparación de semen para la inseminación intrauterina (Revisión Cochrane traducida). En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2007 Número 4. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de The Cochrane Library, 2007 Issue 4. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
21. Arslan M, Morshedi M, Arslan EO, et al. Predictive value of the hemizona assay for pregnancy outcome in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation with intrauterine insemination. *Fertil Steril* 2006; 85:1697-707.