

RECUPERACION DE ESPERMATOZOIDES MOVILES (REM) EN RELACION
CON EL SEMEN FRESCO.

Dolors Company, Pilar Martín, Silvia Menéndez i Simón Marina
Instituto de Reproducción CEFÉR.
c/ Lázaro Cárdenas 2, bis. 08021 Barcelona

Introducción:

Los primeros trabajos de Fertilización "in vitro" en la especie humana datan de 1965 (1,2), pero comenzaron hacia 1963. Un fisiólogo inglés, profesor en la Universidad de Cambridge, el doctor Edwards, fue el primero en conseguir la maduración de los oocitos humanos "in vitro", tras cultivo de fragmentos de ovario. Aproximadamente en 1968, forma un grupo de trabajo en el que se incluye uno de los más prestigiosos laparoscopistas de Europa, el Dr. Steptoe. En 1969 y 1970 (3, 4, 5) publican sus primeros resultados sobre el crecimiento de los embriones humanos "in vitro" y sobre la recogida de los oocitos por laparoscopia.

En 1976 realizan la primera transferencia del embrión con éxito (6), pero resultó en un embarazo ectópico. Finalmente, el 25 de Julio de 1978 ven culminados todos sus esfuerzos al nacer por cesárea la primera niña viva concebida mediante esta técnica.

A partir de este éxito, la técnica de Edwards y Steptoe comienza a extenderse por todo el mundo.

Una de las indicaciones de la fecundación in vitro (FIV) es por baja calidad seminal que no se ha podido normalizar con ningún tratamiento andrológico. No existe ninguna prueba

de laboratorio que permita conocer con seguridad si unos espermatozoides móviles son fértiles o no. La única prueba es la F.I.V. . No obstante sí se puede conocer si un semen dado contiene suficiente número de espermatozoides que permita hacer F.I.V. o inseminación artificial (I. A.) intrauterina. Para inseminar un oocito utilizamos 150000 espermatozoides móviles. Para I.A. intrauterina se considera que se han de depositar en el útero al menos 5 millones de espermatozoides móviles. En ambas técnicas no se usa semen completo sino que hay que eliminar el plasma seminal y recuperar sólo los espermatozoides móviles capacitándolos. En este proceso de capacitación espermática se recuperan menos espermatozoides móviles de los que había en el semen recién eyaculado. Pero, ¿qué porcentaje se recupera?. ¿Es el mismo porcentaje en todos los sémenes?.

El objetivo de este trabajo es correlacionar el número de espermatozoides móviles recuperados (REM: recuperación de espermatozoides móviles) con el número de espermatozoides móviles presentes en el semen recién eyaculado.

Material y Métodos:

El número total de espermatozoides móviles presentes en un semen se ha obtenido evaluando el porcentaje de espermatozoides móviles traslativos (suma de motilidad grado 2 y grado 3), según el método subjetivo y por personal experimentado. Con este dato y el recuento espermático total se halla el número total de espermatozoides móviles presentes en un semen.

REM o Capacitación espermática: preparación del semen para FIV:

Los pacientes son avisados de guardar período de abstinencia sexual de 3 a 7 días previo a la punción ecográfica. Después de la clasificación de los oocitos se solicita la entrega de la muestra.

El semen es recogido por masturbación en frasco estéril y entregado en el Laboratorio en el mínimo plazo posible; se espera a que se licúe para iniciar su procesamiento.

Se pasa el semen con pipeta Falcon de 10 ml a tubo Falcon de 10 ml. Se evalúa el volumen, viscosidad, movilidad y concentración.

Se separa 1 ml con pipeta Falcon de 1 ml y se reparte en 4 tubos Falcon de fondo cónico con tapas de rosca; a cada tubo se le añaden 0,25 ml de medio de cultivo de inseminación (MI). Se centrifuga a 400 g durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante aspirándolo con pipeta Pasteur estéril y se pasa a otro tubo Falcon de 10 ml.

A los pellets se les agregan 0,25 ml de MI. Se vuelve a centrifugar, y se descarta el sobrenadante.

Se agregan 0,25 ml de MI a cada uno de los tubos. En este paso se actúa con sumo cuidado a efectos de no deshacer el pellet: dejar deslizar el MI por la pared del tubo, no agitar, trasladar los tubos sin moverlos, ...

Los tubos se colocan en gradilla con inclinación de 45° para dar mayor superficie de contacto Pellet-MI. Al MI nadarán los espermatozoides con mejor movilidad que son los que queremos recuperar.

Se mantienen en el incubador de 5% de CO₂ en aire, a 37°C durante 1 hora. Durante la incubación los detritus y espermatozoides inmóviles quedan en el fondo.

Pasada la hora se recuperan los sobrenadantes con pipeta Pasteur estéril juntándolos en tubo Falcon de 5 ml. Se manipula con mucho cuidado para no aspirar el pellet.

Se evalúa volumen, movilidad y concentración del recuperado.

El MI utilizado es HAM's F10 suplementado con suero materno al 7,5% (v/v)

Todo el procesamiento tiene lugar en un ambiente estéril: campana de flujo laminar. Para los dos lavados se utiliza MI de un tubo y para la incubación se pone MI de otro; ésta es una medida de precaución (contaminación y cambio de pH).

Resultados:

En los años que llevamos trabajando en fecundación in vitro (FIV) hemos observado la discordancia entre la REM de diferentes sémenes que presentan un recuento y movilidad espermática parecidas en el estudio en fresco. En este trabajo vamos a presentar la REM obtenida de 95 sémenes.

Grupo A: 53 casos de sémenes cuyo número total de espermatozoides móviles en fresco ($\times 10^6$) era superior a 40: con una media de 264'2, con límite entre 43'2 y 1808'4.

La Recuperación de espermatozoides móviles de este grupo presenta una media de 25'4, con límites entre 1'7 y 112. Expresado en % de recuperación, la REM fue de media 12'1% con límites entre 0'9% y 47'7%.

Grupo B: 42 casos de sémenes cuyo número total de espermatozoides móviles en fresco ($\times 10^6$) era inferior a 40: con una media de 13'3, con límites entre 0'08 y 39'2.

La Recuperación de espermatozoides móviles de este grupo presenta una media de 2'2, con límites entre 0'017 y 11'9. Expresado en % de recuperación la REM fue de media 16'7%, con límites entre 1'01% y 69'2%

Discusión:

La tasa de recuperación de espermatozoides móviles es muy variable (del 0'9% al 69'2%) en relación al número total de espermatozoides móviles presentes en la muestra en fresco. En ambos grupos, a pesar de tener diferente concentración de espermatozoides móviles totales en fresco, encontramos que la tasa de recuperación utilizando la técnica del REM es similar: en el primer grupo del 12'1% y en el segundo del 16'7%.

Pensamos que factores que no han sido tenidos en cuenta en este trabajo, como serían la viscosidad seminal y la morfología espermática, podrían influir en la recuperación de los espermatozoides móviles.

Como conclusión queremos destacar la importancia que tiene la realización del test de la recuperación de espermatozoides móviles (REM) como paso previo en aquellas parejas que vengán a iniciar un ciclo de FIV o inseminación artificial (IA) pues no podemos conocer, a partir del semen en fresco, de cuantos espermatozoides móviles vamos a disponer en el momento de la FIV ó IA. El número obtenido en el REM ayudará al clínico a indicar desde el punto de vista masculino, IAC, FIV ó ninguna de las dos técnicas.

Bibliografía

1. EDWARDS, R.G. (1965). Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature, 208, 349-351.
2. EDWARDS, R.G. (1965). Maturation in vitro of human ovarian oocytes. Lancet, 2, 926-929.
3. EDWARDS, R.G.; BAVISTER, B.D. & STEPTOE, P.C. (1969). Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. Nature, 221, 632-635.
4. EDWARDS, R.G.; STEPTOE, P.C. & PURDY, J.M. (1970) Fertilization and cleavage in vitro of preovulatory human oocytes. Nature, 227, 1307-1309.
5. STEPTOE, P.C. & EDWARDS, R.G. (1970) Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after friming of ovaries with gonadotrophins. Lancet, 1, 683-689.
6. STEPTOE, P.C. & EDWARDS, R.G. (1976). Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. Lancet, 1, 880-882.