

Comparación de la sobrevida y de los patrones de movilidad de espermatozoides incubados en medios HAM'S-F10 y G-IVF.

Br. Yoeli Méndez L^a, MgSc. María Teresa Urbina, ^b MgSc. Randolpho Medina ^b, Drs. Isaac Benjamín, Jorge Lerner^b.

^a Laboratorio de Citogenética. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. ^b Unidad de Fertilidad Unifertes, Clínica El Ávila. Caracas, Venezuela.

RESUMEN

Objetivo: Comparar la sobrevida y la movilidad de espermatozoides incubados en medios HAM'S-F10 y G-IVF.

Métodos: Estudio prospectivo. Se incubaron submuestras de espermatozoides recuperados por gradientes de densidad de 31 hombres normospermicos, en los medios respectivos por 18 a 20 horas en una atmósfera de 5 % CO₂. Posteriormente se evaluaron la sobrevida y la movilidad espermáticas. Las diferencias encontradas se evaluaron mediante la t de Student para muestras apareadas con transformación arco seno.

Ambiente: Unidad de Fertilidad Unifertes, Clínica El Ávila. Caracas, Venezuela

Resultados: La sobrevida y la movilidad progresiva espermáticas fueron significativamente mayores en el grupo tratado con G-IVF (P<0,01). Consecuentemente, la media del porcentaje de espermatozoides inmóviles fue significativamente menor (P<0,01).

Conclusión: La sobrevida y la movilidad progresiva en espermatozoides incubados con G-IVF fueron significativamente mayores que con HAM'S-F10.

Palabras clave: Espermatozoide. Sobrevida espermática. Movilidad espermática. HAM'S-F10. G-IVF.

ABSTRACT

Objective: To compare survival and motility of sperm incubated in HAM'S-F10 and G-IVF media.

Methods: Subsamples of motile sperm recovered by density gradients of 31 normospermic men were incubated in each medium for 18-20 hours in 5 % CO₂ atmosphere. Subsequently, sperm survival and motility were assessed.

Setting: Unidad de Fertilidad Unifertes, Clínica El Ávila. Caracas, Venezuela

Results: Average sperm survival and progressive motility were significantly higher in G-IVF (P<0.01). Consequently, average percentage of immotile sperm was significantly lower (P<0.01).

Conclusion: Sperm survival and progressive sperm motility were significantly higher in G-IVF medium than in HAM'S-F10.

Key words: Sperm. Sperm survival. Sperm motility. HAM'S-F10. G-IVF.

INTRODUCCIÓN

La manipulación de gametos masculinos en las técnicas de reproducción asistida (TRA) requiere condiciones que garanticen la movilidad, la vitalidad, la sobrevida y la capacidad fecundante de los mismos. Entre estas condiciones se encuentran la temperatura, la velocidad de centrifugación, el factor de dilución, los medios de cultivo, los suplementos y la no exposición a materiales potencialmente tóxicos (1).

Para que los espermatozoides puedan llevar a cabo su maduración final o capacitación (capacidad de

fecundar al ovocito) deben ser separados del plasma seminal (ya que éste posee factores decapacitantes) y resuspendidos en medios de cultivo. Estos son soluciones nutritivas que pueden contener sales inorgánicas, piruvato, glucosa, vitaminas, aminoácidos, entre otros compuestos, y pueden ser preparados en el laboratorio, aunque generalmente son adquiridos listos para su uso, debido a que garantizan un mejor control de calidad (2).

MOVILIDAD ESPERMÁTICA

Los medios de cultivo usados inicialmente en TRA fueron aquellos que habían sido diseñados para incubar células somáticas (por ejemplo HAM'S F-10, y Earle's), o para cultivarlas, y que fueron adaptados posteriormente para fecundación *in vitro* (FIV) o cultivo embrionario en animales (por ejemplo Tyrode's, T6 o WM). Otros medios más recientes fueron desarrollados especialmente para la FIV, en base a la composición conocida de los fluidos de las trompas y del útero.

Los medios de cultivo se pueden clasificar en simples y complejos. Los medios simples son soluciones de sales balanceadas con fuentes de energía, por ejemplo: Earle's, Tyrode's, T6, WM1, Pool's P1, Quinn's HTF, Gardner's G1. Los medios complejos contienen además de estos compuestos, aminoácidos, vitaminas y otros cofactores, por ejemplo: HAM'S F-10, Menezo's B2 and B3 media, Eagle's modified essential medium (MEM), Behr's Blastocyst Medium.

La presencia de bicarbonato y albúmina en la formulación de los medios para TRA resulta fundamental para el proceso de capacitación espermática. El flujo de bicarbonato hacia el interior del espermatozoide promueve la activación de la adenilciclase generando un incremento en la concentración de AMPc, actuando este último en la vía de señalización de la capacitación. Por otro lado, la albúmina se encuentra presente *in vivo* en el moco cervical y es conocida por la remoción de colesterol de la membrana espermática, lo que desencadena un cambio en su estructura y potencial iónico favoreciendo la exposición de proteínas necesarias para la interacción espermatozoide-ovocito e iniciando la hiperactivación espermática (3).

La movilidad espermática es un factor que depende de la fuente energética que contenga el medio de cultivo. Generalmente se añade glucosa al medio, siendo ésta importante para la FIV pero dañina durante el cultivo del cigoto (4).

Se ha documentado que algunos medios pueden contener compuestos que pueden causar efectos negativos sobre los gametos y los embriones (5-11). Como ejemplo se tiene la hipoxantina en el medio HAM'S-F10 (Cuadro 1), que está asociada con la generación de cantidades excesivas de especies oxígeno reactivas (5,11), lo cual se encuentra directamente relacionado con la pérdida de la movilidad espermática (7).

Entre los nuevos medios para la manipulación de espermatozoides, que han sido formulados especialmente para FIV, en base a la composición química de los fluidos de las trompas y del útero, se

encuentran los medios de la serie G5, específicamente G-IVF (Cuadro 2).

Cuadro 1

Composición del medio HAM'S-F10.

CaCl ₂ (Anhidro)	MgSO ₄ (Anhidro)
CuSO ₄ 5H ₂ O	NaCl
FeSO ₄ 7H ₂ O	NaH ₂ PO ₄ (Anhidro)
KCl	ZnSO ₄ 7H ₂ O
KH ₂ PO ₄	
L-Alanina	L-Leucina
L-Arginina HCl	L-Lisina HCl
L-Asparagina H ₂ O	L-Metionina
L-Ácido aspártico	L-Fenilalanina
L-Cisteina HCl H ₂ O	L-Prolina
L-Ácido glutámico	L-serina
L-Glutamina	L-Treonina
Glicina	L-Triptófano
L- Histidina HCl H ₂ O	L-Tirosina 2Na 2H ₂ O
L Isoleucina	L-Valina
d-Biotina	Piridoxina
D-Ca Pantotenato	Riboflavina
Choline Chloride	Tiamina HCl
Ácido fólico	Timidina
Hipoxantina 2Na	Vitamina B ₁₂
Myo-Inositol	Ácido lipoico
Niacimadina	
D-Glucosa	Piruvato de sodio
Rojo fenol	NaHCO ₃

Cuadro 2

Composición del medio G-IVF.

Alanil-Glutamina	L-Glutamato
Cloruro de Calcio 2H ₂ O	L-Prolina
Citrato	L-Serina
EDTA	Sulfato de magnesio
7H ₂ O	
Fructosa	Cloruro de potasio
Gentamicina	Sodium dihydrogen orthophosphate 1-hydrate
	Bicarbonato de sodio
Glucosa	Lactato de sodio
Glicina	Piruvato de sodio
L-Asparagina H ₂ O	Taurina
L-Alanina	Agua para inyección
L-Aspartato	

El medio G-IVF es un medio complejo que contiene EDTA y alanil-glutamina. La incorporación de EDTA en G-IVF ha representado un avance significativo en la disminución del daño ocasionado por especies

oxígeno reactivas (ROS) a los gametos (5). Por otro lado, la presencia de amonio en el medio de cultivo puede reducir la movilidad, la vitalidad y la reacción acrosómica espermáticas (10). Con el fin de disminuir la concentración de amonio en el medio y evitar que estos parámetros espermáticos fueran alterados se sustituyó la glutamina por la alanil-glutamina en G-IVF (6).

El objetivo del presente trabajo fue comparar el efecto de los medios HAM'S-F10 y G-IVF sobre los parámetros movilidad y sobrevida espermáticas, dos de los indicadores del potencial fecundante.

MÉTODOS

Obtención de la muestra

Es un estudio prospectivo y descriptivo. Las muestras seminales se obtuvieron de 31 hombres normospermicos que acudieron al Laboratorio de Andrología de la Unidad de Fertilidad Unifertes (Caracas, Venezuela). La toma de las muestras se hizo por masturbación luego de 3 a 5 días de abstinencia sexual.

El análisis seminal incluyó evaluación del volumen, el pH y la viscosidad seminales, la concentración, la movilidad, la morfología, y la viabilidad espermáticas, bajo los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Valoración de la sobrevida espermática y patrones de movilidad

Las muestras de semen procesadas mediante gradientes de densidad se dividieron en dos alícuotas o submuestras: 200 000 espermatozoides móviles se resuspendieron en un tubo de ensayo con 1 mL de medio HAM'S-F10 y un número igual en otro tubo con 1 mL de medio G-IVF (Vitrolife, Suecia). Los medios fueron previamente suplementados con HSA 0,5 % y equilibrados en una atmósfera de 5 % CO₂ a 37°C.

Luego, los tubos con las suspensiones espermáticas fueron incubados a una atmósfera de 5 % CO₂ a 37°C por 18-20 horas y, tras sacarlos de la incubadora, se procedió a colocar 40 µL de cada una de las muestras en un portaobjetos para evaluar la sobrevida y los patrones de movilidad espermáticos.

Para la valoración de la sobrevida espermática fueron evaluados 100 espermatozoides por muestra, clasificándolos en móviles e inmóviles. Mientras que la valoración de los patrones de movilidad se basó en el conteo de 100 espermatozoides por muestra y su

clasificación en progresivos (rápidos y moderados), lentos, móviles *in situ* e inmóviles

Análisis estadístico. La evaluación de la sobrevida espermática se realizó a una población de 31 pacientes, mientras que los patrones de movilidad se evaluaron en 18 pacientes. El análisis estadístico se basó en una comparación de las medias de las submuestras utilizando t de Student para muestras apareadas con transformación arco seno, a un nivel de significancia de $P < 0,05$, realizado con el paquete estadístico SAS (12).

RESULTADOS

La sobrevida y la movilidad progresiva espermáticas fueron significativamente mayores en el grupo tratado con G-IVF ($P < 0,01$).

Se observó que el grupo tratado con HAM'S-F10 presentó una media de 71,9 % de sobrevida, mientras que con G-IVF se obtuvo una media de 74,7 % (Figura 1).

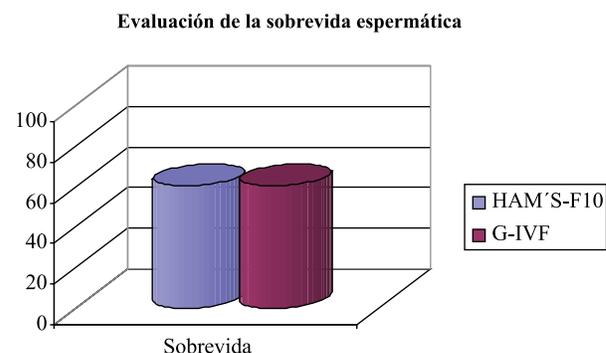


Figura 1. Comparación de la sobrevida espermática después de la incubación en medios HAM'S-F10 y G-IVF ($P < 0,01$)

La movilidad progresiva espermática (Figura 2) fue significativamente mayor al incubar en medio G-IVF, obteniéndose una media de 62 % de espermatozoides móviles progresivos con G-IVF y de 50 % con HAM'S F-10 ($P < 0,01$).

No hubo diferencias significativas entre las medias de espermatozoides con movilidad lenta e *in situ* entre tratamientos.

La media de espermatozoides inmóviles para G-IVF (17 %) fue significativamente menor que la obtenida para HAM'S-F10 (23 %; $P < 0,01$).

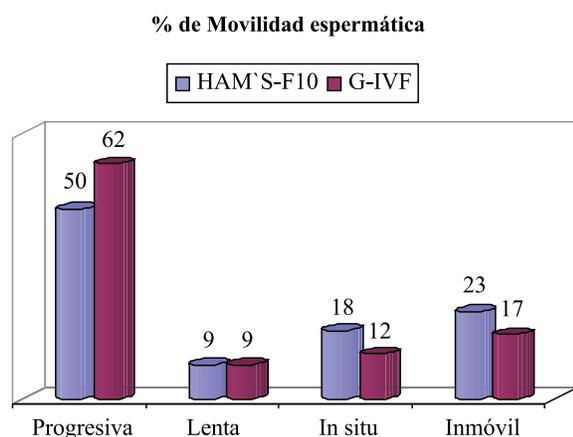


Figura 2. Comparación de los patrones de movilidad espermática después de la incubación en medios HAM'S-F10 y G-IVF (*, ** P<0,01)

DISCUSIÓN

La sobrevida y la movilidad progresiva espermáticas fueron significativamente mayores en el grupo tratado con G-IVF. Consecuentemente, el porcentaje de espermatozoides inmóviles fue significativamente menor en este grupo también. Tales variaciones en la sobrevida y los patrones de movilidad son atribuibles a la composición de los medios de cultivo estudiados.

La hipoxantina es una forma metabólica de las purinas que forma parte de la composición del medio HAM'S-F10. Dicha molécula pudo jugar un papel fundamental en la baja movilidad progresiva en las muestras tratadas con HAM'S-F10. La hipoxantina aumenta la producción de especies de oxígeno reactivas (5,11), lo cual se encuentra directamente relacionado con pérdida de la movilidad espermática (7), aunque el HAM'S-F10 contiene ácido lipoico, considerado el antioxidante de los antioxidantes.

Por su parte, el medio G-IVF contiene elementos diferentes a los del HAM'S-F10 que pudieron influir notoriamente en la movilidad espermática. Entre estos se encuentran el EDTA, la taurina, el lactato de sodio y la alanil-glutamina.

El EDTA actúa como un agente quelante del hierro y de cationes divalentes de metales pesados, que pueden provenir en trazas como contaminantes en los medios y de los plásticos. La quelación de hierro contribuye a una menor generación de ROS, así como también mantiene la actividad enzimática de la adenil ciclasa la cual genera AMPc (5).

La taurina es una molécula antioxidante que se encuentra presente en espermatozoides de mamíferos y en el tracto reproductivo, siendo esencial para la capacitación y movilidad de los espermatozoides, así como para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (8).

El lactato de sodio junto con el piruvato de sodio son utilizados como sustratos para la obtención de energía en forma de ATP, necesaria para la movilidad de los espermatozoides especialmente para la hiperactivación flagelar (9).

Otro factor importante a considerar en la formulación de medios para TRA es disminuir la formación de amonio ya que, se ha demostrado que la presencia de amonio en el medio de cultivo reduce la movilidad, la vitalidad y la reacción acrosómica en los espermatozoides (10), así como que también tiene efectos negativos en el desarrollo y en la diferenciación de los embriones en cultivo, lo que puede alterar las tasas de crecimiento fetal y la normalidad en una concentración de 300 μ moles/L. Además, la presencia de amonio afecta el metabolismo del embrión, el pH, la regulación y la expresión génica (lo cual puede estar asociado a los riesgos de la FIV: nacimientos con bajo peso y malformaciones como los síndromes de Angelmans y Beckwith Wiedemann) (6).

El principal componente de la concentración de amonio en los medios proviene de la desaminación de los aminoácidos presentes en el medio, una vez que éste es incubado a 37°C (6). El aminoácido más lábil es la glutamina y está presente en el medio HAM'S-F10; en cambio en el medio G-IVF éste es sustituido por el dipéptido alanil-glutamina. La alanil-glutamina presenta la misma efectividad que la glutamina, sin embargo no sufre desaminación a 37°C, por lo que se observa una disminución de la concentración de amonio (6), que posiblemente explique la alta movilidad progresiva observada en las muestras tratadas con G-IVF en este trabajo.

La presencia de estos compuestos en el medio G-IVF mejora la sobrevida y la movilidad espermáticas. Parámetros que son importantes en el caso de la manipulación de muestras de pacientes oligoastenozoospermicos, en los que un manejo adecuado puede marcar la diferencia entre la indicación de FIV o inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI).

Por último, trabajar con los mejores medios para TRA es un deber para aumentar la tasa de nacimientos vivos y minimizar los riesgos de la FIV.

REFERENCIAS

1. Trounson A, Gardner D. Handbook of *in vitro* fertilization. 2º ed. Boca Ratón: Informa HealthCare, 1999.
2. Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. Manual de Procedimientos. Laboratorio de Reproducción Asistida. 2006. En: http://www.redlara.com/fdash45o9.asp?ARQ=LIVRETO_esp_01_2007.pdf
3. De Jonge C, Barratt C. The sperm cell : production, maturation, fertilization, regeneration. 1º ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.
4. Mahadevan M, Miller M, Moutos D. Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics *in vitro*. Hum Reprod. 1997;12:119-123.
5. Quinn P. Review of media used in ART Laboratories. J Androl. 2000;21:610-615.
6. Gardner D, Lane M. Culture systems for the human embryo. En: Gardner D, Weissman A, Howles C, Shoham Z, editores. Textbook of Assisted Reproductive Technologies. Laboratory and Clinical Perspectives. 3º ed. Londres: Editorial Informa, 2009. p.219-240.
7. Twiig J, Fulton N, Gomez E, Irvine D, Aitken R. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa. Hum Reprod. 1998;13:1429-1436.
8. Donnelly E, McClure N, Lewis S. Glutathione and hypotaurine *in vitro*: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. Mutagenesis. 2000; 15 (1): 61-68.
9. Fernández R, Gutiérrez G, Gómez N, Hernández P. Motilidad y sobrevivencia espermática *in vitro* con la utilización de pirofosfato de tiamina en semen caprino. Rev Salud Anim. 2003;25:34-38.
10. Tareq K, Hossain S, Akter Q, Sawada T, Afrose S, Hamano K, Tsujii H. Effect of amino acids and dipeptides on the acrosome reaction and accumulation of ammonia in porcine spermatozoa. Reprod Med Biol. 2008;7:123-131.
11. Loutradis D, John D, Kiessling AA. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. Biol Reprod. 1987;37:311-316.
12. SAS Institute Inc. Paquete estadístico SAS. Copyright © SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, North Carolina 27513, USA. 1999.



Sociedad de Obstetricia y Ginecología de Venezuela

Invita al

XXVI Congreso Nacional de Obstetricia y Ginecología

11 al 14 de marzo de 2010

Hotel Eurobuilding Caracas

Caracas, DC

Información e inscripciones:

- Sede de la Sociedad de Obstetricia y Ginecología de Venezuela, Maternidad Concepción Palacios, Av. San Martín, Caracas. e-mail: sogvzla@cantv.net • www.sogvzla.org
Teléfono: (+58-212) 461.6442- Fax: (+58-212) 451.0895
- CONGREX C.A. Av Blandín, Centro Comercial Mata de Coco, Piso 3, Oficina Oeste, La Castellana, Caracas. Teléfono: (+58-212) 263.9733 - Fax: (+58-212) 263.8443 - 3672. www.congrex.com