El laboratorio de Andrología en Reproducción Asistida

Capacitación espermática y nuevos criterios OMS 2010

Patricia Nieto-Sandoval Martín de la Sierra
R3 Análisis Clínicos
Mayo 2011

Laboratorio de Andrología

- Gestión del banco de donantes de semen
- Seminograma para el estudio de infertilidad del varón
- Congelación/Descongelación
- Capacitación de muestras de semen
- Técnicas especiales:
  - Fragmentación del DNA espermático
  - Lavado de semen para VIH/VHC
  - FISH espermatozoides
  - Microdelecciones del cromosoma Y

Banco de semen de donantes

- Servicio existente en Centros de Reproducción en el que se obtienen, conservan y gestionan muestras de semen de donantes sanos para su posterior utilización en tratamientos de reproducción asistida.
- **UTILIZACIÓN:**

✓ Parejas con varón azoospérmico

✓ Riesgo de transmisión de trastornos genéticos o enfermedades infecciosas (VIH, VHC…)

✓ Fallos repetidos de ICSI sin causa femenina aparente

✓ Mujeres monoparentales

Banco de semen de donantes

- Entrevista personal
- 1ª prueba: seminograma
- 2ª prueba: congelación, descongelación y capacitación
- 3ª prueba:
- ✓ Entrevista con un psicólogo
- ✓ Analítica

Hemograma, grupo y Rh
Coagulación
Serología: Hepatitis B y C, VIH, RPR, CMV
Cultivo de semen y orina
Cariotipo
Fibrosis Quística

Si OK

5-10% ACEPTADOS

Contrato
Consentimiento informado

Donación
25 muestras

Nueva serología
a los 6 meses

Criterios de selección de donantes y de muestras durante la donación

- **Valores mínimos para aceptación de donantes:**

Concentración > 70millones/ml
Movilidad >50%
Morfología >4%
EN CONJUNTO, SIEMPRE TOTAL DE MÓVILES >80 MILLONES

- **Aceptación de muestras durante la donación:**

Concentración > 50millones/ml
Movilidad >50%
EN CONJUNTO, SIEMPRE TOTAL DE MÓVILES >70 MILLONES

IVI MADRID

MAX DEF:

MAX PROV:

CONTROL DE SELECCIÓN DE DONANTES

FECHA: NHC:

NOMBRE: APELLIDOS:

CÓDIGO:

NACIONALIDAD: TLF:

ENTREVISTA
- AMIGOS
- CAMBIO DE TLF

- Edad: • Ocupación/Estudios: • Gafas:
- Hábitos (drogas, alcohol....): ¿Cuánto?:
- Hijos: • Antecedentes familiares:
- Enfermedades padecidas (distintas a las infantiles):
- Anteriores donaciones: • Días de abstinencia:
- *¿Cómo te enteraste?:* • *Motivos para donar:*

1ª PRUEBA	*SEMEN FRESCO*	*DESCONGELADO*	*CAPACITADO*
VOLUMEN			
CONCENTRACIÓN			
ESP. TIPO B			
A+B: %	$A+B_{FRESCO}$ >80	$A+B_{DESC}$:	$A+B_{CAPAC}$: >4.5
MORFOLOGIA	NORMALES:		
Repetición			
VOLUMEN			
CONCENTRACIÓN			
ESP. TIPO B			
A+B: %	$A+B_{FRESCO}$:	$A+B_{DESC}$:	$A+B_{CAPAC}$:

APTO NO APTO

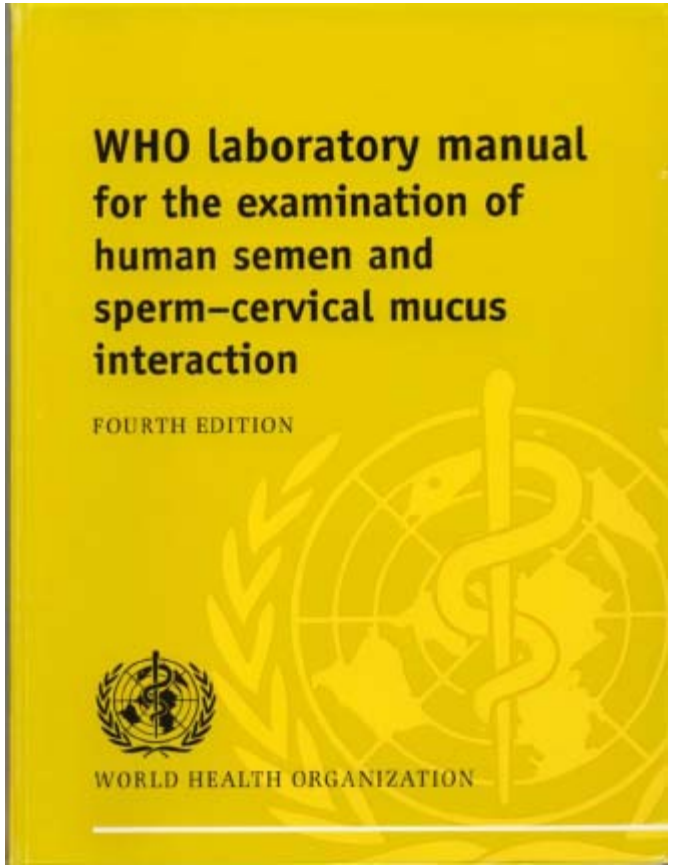
$$A+B=\frac{VxCxB}{100}$$

	REM
IA	>$3x10^6$ spz totales
FIV	>200-500 $x10^3$/ml
ICSI	Spz móviles aislados

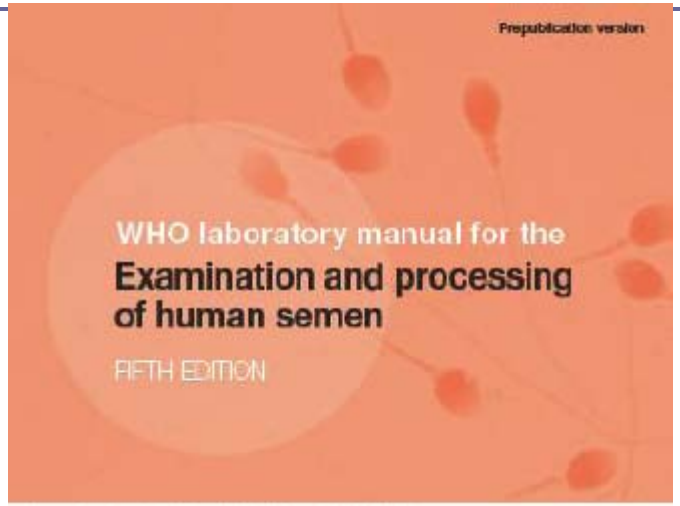
Nuevos valores de referencia para el seminograma.

OMS 2010

SEMINOGRAMA: NUEVOS CRITERIOS OMS 2010



1999



2010

SEMINOGRAMA: NUEVOS CRITERIOS OMS 2010

Valores referencia OMS 1999	
Volumen	≥2ml
pH	≥ 7.2
Concentración spz móviles/ml	≥20millones
Total spz en eyaculado	≥40millones
Movilidad lineal progresiva (a+b)	≥50%
Movilidad lineal rápida (a)	≥25%
Morfología normal	≥14%
Vitalidad	≥75%
Presencia de leucocitos	<1millón/ml

Limitaciones:

-No se definió una población de referencia
-Colaboración de laboratorios sin control de su metodología

Espermatozoide normal. Criterios estrictos de Tygerberg

Kruger et 1986/OMS 1992/99:

- Cabeza ovalada
- Acrosoma 40-70% de la cabeza
- Sin >20% de vacuolas
- Pieza media axial sin extensiones
- Citoplasma > 1/3 de cabeza.
- Cola extendida, aprox. 10 veces la cabeza

SEMINOGRAMA: NUEVOS CRITERIOS OMS 2010

human reproduction update

World Health Organization reference values for human semen characteristics*,‡

Trevor G. Cooper[1,10], Elizabeth Noonan[2], Sigrid von Eckardstein[3], Jacques Auger[4], H.W. Gordon Baker[5], Hermann M. Behre[6], Trine B. Haugen[7], Thinus Kruger[8], Christina Wang[9], Michael T. Mbizvo[3,†], and Kirsten M. Vogelsong[3,†]

[1]Centre of Reproductive Medicine and Andrology of the University, Domagkstrasse 11, D-48129 Münster, Germany [2]Fred Hutchinson Cancer Research Center, SCHARP Statistical Center for HIV/AIDS Research and Prevention, Seattle, WA, USA [3]UNDP/UNFPA/WHO/World Bank Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction (HRP), Department of Reproductive Health and Research, WHO, CH-1211 Geneva 27, Switzerland [4]Service d'Histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction/CECOS, Pavillon Cassini, Hôpital Cochin, Paris, France [5]Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Melbourne, Royal Women's Hospital, Carlton, VIC, Australia [6]Center for Reproductive Medicine and Andrology, University Hospital Halle, Martin Luther University, Halle, Germany [7]Faculty of Health Sciences, Oslo University College, Oslo, Norway [8]Reproductive Biology Unit, Stellenbosch University, Tygerberg, South Africa [9]Harbor-UCLA Medical Center and Los Angeles Biomedical Research Institute, Torrance, CA, USA

Grupo de referencia:

Varones con TTP ≤ 12 meses, 1953 muestras

Estudio de la calidad seminal de la población general:

- UNSCR: hombres con fertilidad desconocida. Representan a la población general. 965 muestras
- SCR: hombres normozoospérmicos según OMS 1999. Historial de fertilidad desconocido. 934 muestras
- No TTP: hombres fértiles con tiempo para concebir desconocido 817 muestras

SEMINOGRAMA: NUEVOS CRITERIOS OMS 2010

Estudio bien definido:

4500 hombres, procedentes de 14 países de 4 continentes
Métodos estandarizados
Siempre muestras completas.
Con 2-7 días de abstinencia.
Solo una muestra por hombre.
Edad:17-67 años.

Table I Location of and methods used by laboratories providing data for this study

Category[1]	City, Country, Continent[2]	N[3]	Semen Volume[4]	Sperm Concentration[5]	Sperm Motility[6]	Sperm Morphology[7]	Reference
Unscreened	Sydney, Australia, AU	225	S	N	37	Q	Turner *et al.* (2003)
Unscreened	Melbourne, Australia, AU	41	C	N	RT	S[8]	WHO (1996), McLachlan *et al.* (2000)
Unscreened	Edinburgh, UK, EU	84	W	N	37	D	Brady *et al.* (2004, 2006), Hay *et al.* (2005), Walton *et al.* (2007)
Unscreened	Manchester, UK, EU	24	P	N	37	P[8]	Unpublished results
Unscreened	Los Angeles, USA, AM	332	P	N	37	P[8]	Gonzalo *et al.* (2002), Qoubaitary *et al.* (2006), Wang *et al.* (2006)
Unscreened	Santiago, Chile, AM	60	P,S	M,N	37	P	von Eckardstein *et al.* (2003), Unpublished results
Unscreened	Münster, Germany, EU	199	GC	N	37	P	Büchter *et al.* (1999), Kamischke *et al.* (2000a, b, 2001a, b, 2002), Unpublished results
Fathers TTP	Melbourne, Australia, AU	206	C	N	RT	S[8]	Stewart *et al.* (2009)
Fathers TTP	Paris, France; Turku, Finland; Copenhagen, Denmark; Edinburgh, Scotland, EU	900	W	N,B,T,Ma	37	S[8]	Auger *et al.* (2001), Jørgensen *et al.* (2001), Slama *et al.* (2002)
Fathers TTP	Columbia, USA, AM	593	W	N	37	P[8]	Swan *et al.* (2003)
Fathers TTP	Oslo, Norway, EU	89	W	N	37	P[8]	Haugen *et al.* (2006)
Fathers TTP	Copenhagen, Denmark, EU	165	C	M,B,T	37	P	Bonde *et al.* (1998), Jensen *et al.* (2001)
Fathers	no TTP Davis, USA, AM	606	P	Mi	37	P[8]	Guzick *et al.* (2001)
Fathers	no TTP Münster, Germany, EU	58	GC	N	37	P	Kamischke *et al.* (2001a), Unpublished result
scr+no TTP	Stockholm, Sweden, EU	37 + 23	W	N	37	P	WHO (1990, 1996)
scr+no	Szeged, Hungary, EU	11 + 5	GC	M	RT	P	WHO (1996)

SEMINOGRAMA: NUEVOS CRITERIOS OMS 2010

Table II Distribution of values, lower reference limits and their 95% CI for semen parameters from fertile men whose partners had a time-to-pregnancy of 12 months or less

	N	Centiles										
		2.5	(95% CI)	5	(95% CI)	10	25	50	75	90	95	97.5
Semen volume (ml)	1941	1.2	(1.0–1.3)	1.5	(1.4–1.7)	2	2.7	3.7	4.8	6	6.8	7.6
Sperm concentration (10^6/ml)	1859	9	(8–11)	15	(12–16)	22	41	73	116	169	213	259
Total number (10^6/Ejaculate)	1859	23	(18–29)	39	(33–46)	69	142	255	422	647	802	928
Total motility (PR + NP, %)*	1781	34	(33–37)	40	(38–42)	45	53	61	69	75	78	81
Progressive motility (PR, %)*	1780	28	(25–29)	32	(31–34)	39	47	55	62	69	72	75
Normal forms (%)	1851	3	(2.0–3.0)	4	(3.0–4.0)	5.5	9	15	24.5	36	44	48
Vitality (%)	428	53	(48–56)	58	(55–63)	64	72	79	84	88	91	92

*PR, progressive motility (WHO, 1999 grades a + b); NP, non-progressive motility (WHO, 1999 grade c).
The values are from unweighted raw data. For a two-sided distribution the 2.5th and 97.5th centiles provide the reference limits; for a one-sided distribution the fifth centile provides the lower reference limit.

Progresivo (a+b)
No progresivos (c)
Inmóviles

Movilidad total: PR+NP ≥ 40%
Movilidad progresiva: PR≥ 32%

"ést feren an la infertilidad sino que indican que el parámetro seminal está por debajo de la gran mayoría (95%) de varones fértiles"

Table II Distribution of values, lower reference limits and their 95% CI for semen parameters from fertile men whose partners had a time-to-pregnancy of 12 months or less

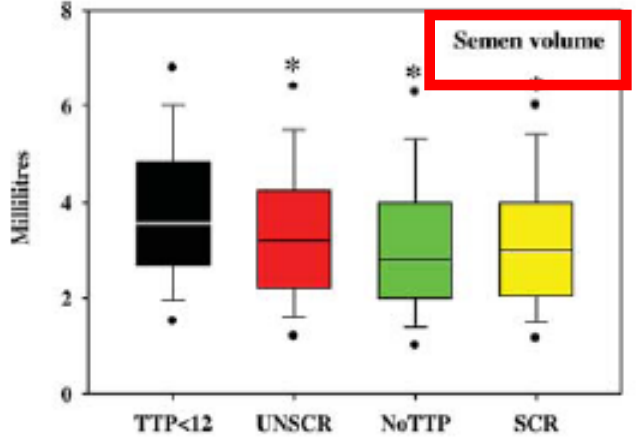
	N	Centiles										
		2.5	(95% CI)	5	(95% CI)	10	25	50	75	90	95	97.5
Semen volume (ml)	1941	1.2	(1.0–1.3)	1.5	(1.4–1.7)	2	2.7	3.7	4.8	6	6.8	7.6
Sperm concentration (10^6/ml)	1859	9	(8–11)	15	(12–16)	22	41	73	116	169	213	259
Total number (10^6/Ejaculate)	1859	23	(18–29)	39	(33–46)	69	142	255	422	647	802	928
Total motility (PR + NP, %)*	1781	34	(33–37)	40	(38–42)	45	53	61	69	75	78	81
Progressive motility (PR, %)*	1780	28	(25–29)	32	(31–34)	39	47	55	62	69	72	75
Normal forms (%)	1851	3	(2.0–3.0)	4	(3.0–4.0)	5.5	9	15	24.5	36	44	48
Vitality (%)	428	53	(48–56)	58	(55–63)	64	72	79	84	88	91	92

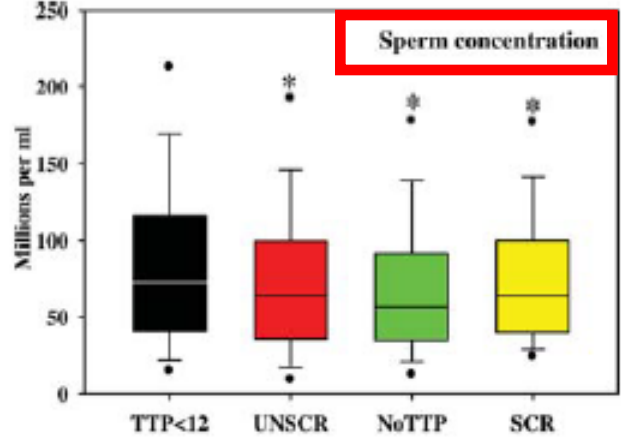
*PR, progressive motility (WHO, 1999 grades a + b); NP, non-progressive motility (WHO, 1999 grade c).
The values are from unweighted raw data. For a two-sided distribution the 2.5th and 97.5th centiles provide the reference limits; for a one-sided distribution the fifth centile provides the lower reference limit.

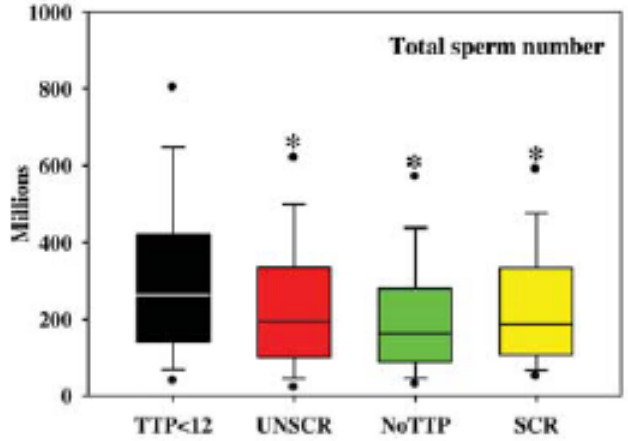
Table III Distribution of values, lower reference limits and their 95% CI for semen parameters from the general population of unscreened men

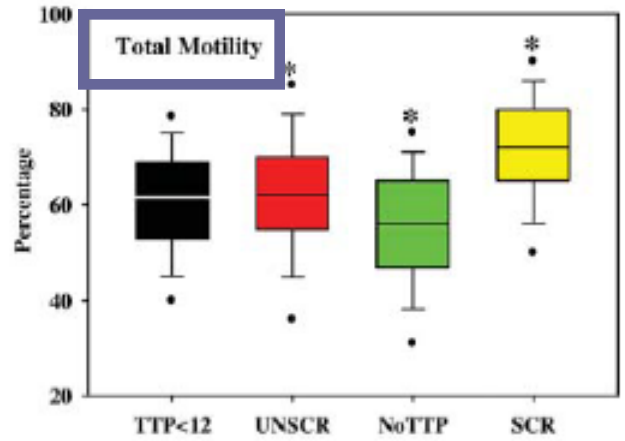
	N	Centiles										
		2.5	(95% CI)	5	(95% CI)	10	25	50	75	90	95	97.5
Semen volume (ml)	929	0.8	(0.7–1.0)	1.2	(1.0–1.3)	1.6	2.2	3.2	4.2	5.5	6.4	7
Sperm concentration (10^6/ml)	930	4	(1–6)	9	(6–11)	17	36	64	100	192	192	237
Total number (10^6/Ejaculate)	928	11	(3–14)	20	(14–29)	45	101	196	336	619	619	772
Total motility (PR + NP, %)*	928	26	(14–32)	36	(32–39)	45	55	62	70	85	85	88
Progressive motility (PR, %)*	708	20	(7–27)	31	(26–34)	39	49	57	65	78	78	81
Normal forms (%)	137	3.5	(2.0–4.5)	4.7	(3.8–5.5)	7	10.5	14	16	23.2	23.2	30

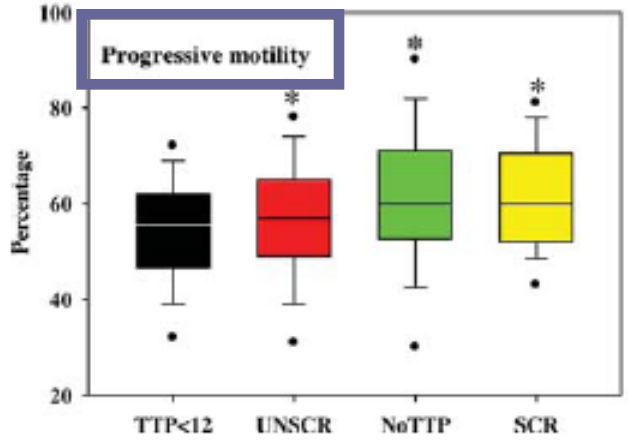
*PR, progressive motility (WHO, 1999 grades a + b); NP, non-progressive motility (WHO, 1999 grade c).
The values are from unweighted raw data. For a two-sided distribution the 2.5th and 97.5th centiles provide the reference limits; for a one-sided distribution the fifth centile provides the lower reference limit.

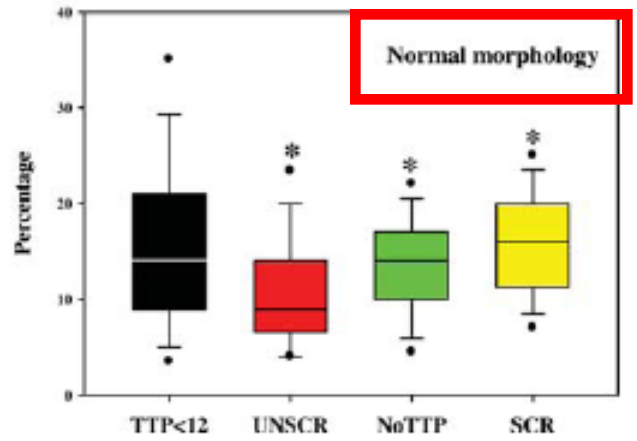

Semen volume
Millilitres
0
2
4
6
8
TTP<12
UNSCR
NoTTP
SCR


Sperm concentration
Millions per ml
0
50
100
150
200
250
TTP<12
UNSCR
NoTTP
SCR


Total sperm number
Millions
0
200
400
600
800
1000
TTP<12
UNSCR
NoTTP
SCR


Total Motility
Percentage
20
40
60
80
100
TTP<12
UNSCR
NoTTP
SCR


Progressive motility
Percentage
20
40
60
80
100
TTP<12
UNSCR
NoTTP
SCR


Normal morphology
Percentage
0
10
20
30
40
TTP<12
UNSCR
NoTTP
SCR

SEMINOGRAMA: NUEVOS CRITERIOS OMS 2010

Tabla 1 – Variación de los parámetros seminales a través del tiempo (1980–2010)

	1980	1987	1992	1999	2010
Volumen (ml)	–		≥2,0		1,5
pH	–		7,2–7,8	≥7,2	
Concentración (10^6/ml)	20–200		≥20		15
Movilidad (%)	≥60		≥50 (progresiva a y b)		40 (a+b+c)
Viabilidad	–	≥50	≥75	≥75	58
Morfología	80,5	≥50	≥30	14	4
Leucocitos	<4,7	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

SEMINOGRAMA: NUEVOS CRITERIOS OMS 2010

- ***Conclusiones del estudio:***
  - La fertilidad masculina depende de muchos factores: no es estática.
  - Los resultados del seminograma tienen que interpretarse junto con la valoración clínica del varón.
  - Los resultados del seminograma NO tienen que interpretarse como diagnóstico de infertilidad si están por debajo de los valores de referencia.
  - El "TTP-Time To Pregnancy" NO depende exclusivamente del varón, sino que debemos tener en cuenta y en igual medida la valoración de la mujer.

Congelación del semen

Tratamiento de conservación y mantenimiento de espermatozoides a temperaturas de -196ºC.

UTILIDADES

- Libertad de utilización del eyaculado
- Semen del donante
- Posibilidad de paternidad tras quimio o radioterapia
- Vasectomias
- Conservación de muestras valiosas
- Dificultad de recogida de la muestra
- Mejora el aprovechamiento de un único eyaculado

DESVENTAJAS

- Disminución de la calidad espermática
- Excepcionalmente supervivencia nula

Congelación del semen

ETAPAS

- Licuefacción
- Recuento y concentración opcional
- Dilución con el crioprotector
- Equilibrado y refrigeración
- Congelación: vapores de nitrógeno
  hielo seco
  descenso programado
- Prueba de descongelación

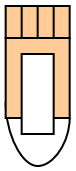
Muy hidrosolubles
Baja toxicidad
Isoosmóticos e isotónicos con el plasma seminal
pH neutro
Compuestos nutritivos
Antibióticos

Sustancias crioprotectoras

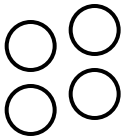
Penetrantes

No penetrantes

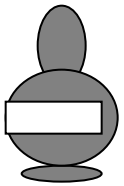
ENVASES



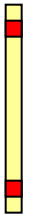
criotubo



píldoras

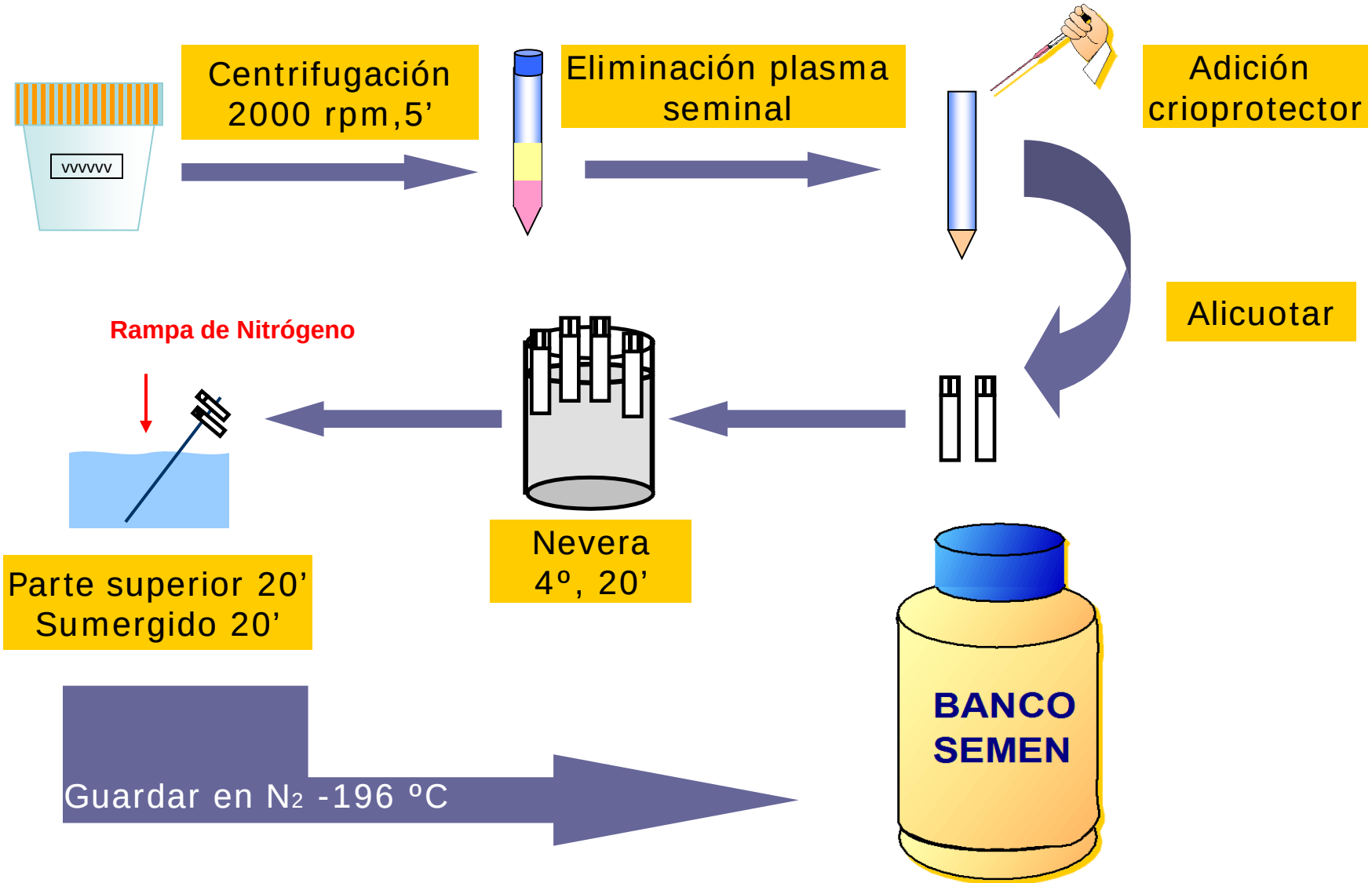


ampolla



pajuela

Congelación del semen: vapores de nitrógeno (congelación “lenta”)



Congelación del semen: Hielo seco (congelación “rápida”)

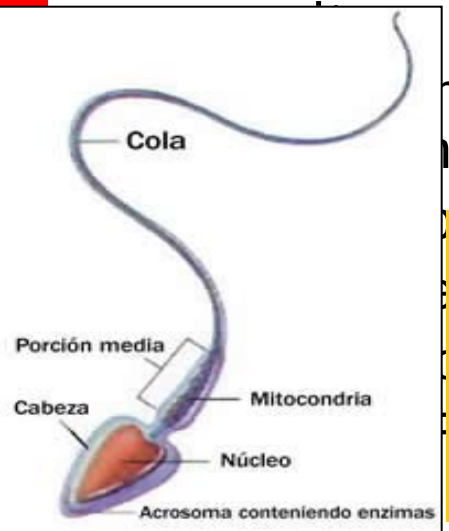
Congelación del semen: descenso controlado de temperatura

- Protocolo de congelación lenta.
- Utiliza un congelador biológico.
- Equipo programable que permite un estricto control de las condiciones para bajar la temperatura fracciones de grado centígrado por minuto.
- El recipiente de congelación donde colocamos la muestra se conecta a un tanque de nitrógeno líquido.
- Mediante un programa específico y sensores especiales, el ordenador registra la temperatura en el interior del recipiente, y según las indicaciones programadas, inyectará vapores de N2 para bajar la temperatura.

Banco de semen

Capacitación espermática

- Fase final del desarrollo del espermatozoide donde adquiere la habilidad de fecundar al ovocito.
- In vivo, ocurre cuando los espermatozoides entran en contacto con los diferentes fluidos del tracto genital femenino. Mientras están en el sistema reproductor masculino está inhibida por sustancias presentes en el plasma seminal.
- Durante la capacitación, el espermatozoide sufre cambios:
- Adquiere la capacidad de unirse a la zona pelúcida del de llevar a cabo la reacción acrosómica.
- niento deja de ser rectilíneo para desplazarse con niento oscilante.



Fusión de la membrana citoplasmática con la membrana acrosomal externa en la zona apical de la cabeza del spz originando la liberación de la enzimas almacenadas en el acrosoma y la exposición de la membrana acrosomal interna.

Capacitación espermática

- **Métodos:**

1- Lavado centrifugado
2- Métodos de migración: Swim-up
3- Métodos de centrifugación: Gradiente de densidad
4- Métodos de filtración

Capacitación espermática: Swim-up

- **Características de la técnica:**
  - Basados en la capacidad de desplazamiento del espermatozoide.
  - Procedimiento más fisiológico
  - Tiempo de duración: entre 60-75 minutos
  - Adecuado para muestras de semen con buenos parámetros seminales

Capacitación espermática: Swim-up

Diluir con medio (1:1)

Centrifugar 2400 rpm 10’

Obtención del pellet

Eliminar sobrenadante

Colocar en 45º

Añadir medio (0.5-1.5ml)

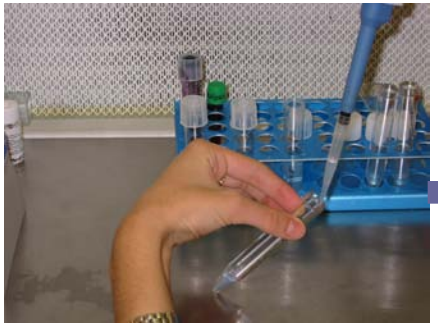
37ºC,45’ en 45º

Recuperar de la superficie

Capacitación espermática: Gradiente de densidad

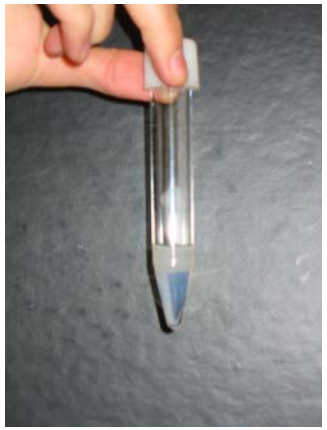
- **Características de la técnica:**
  - Basados en la capacidad de separación por la densidad celular
  - Tiempo de duración: 45-60 minutos
  - Procedimiento menos fisiológico
  - Adecuado para muestras de semen con bajos parámetros seminales

Capacitación espermática: Gradiente de densidad

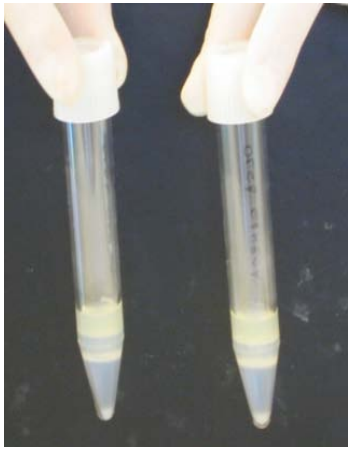


Preparación gradientes

Añadir semen



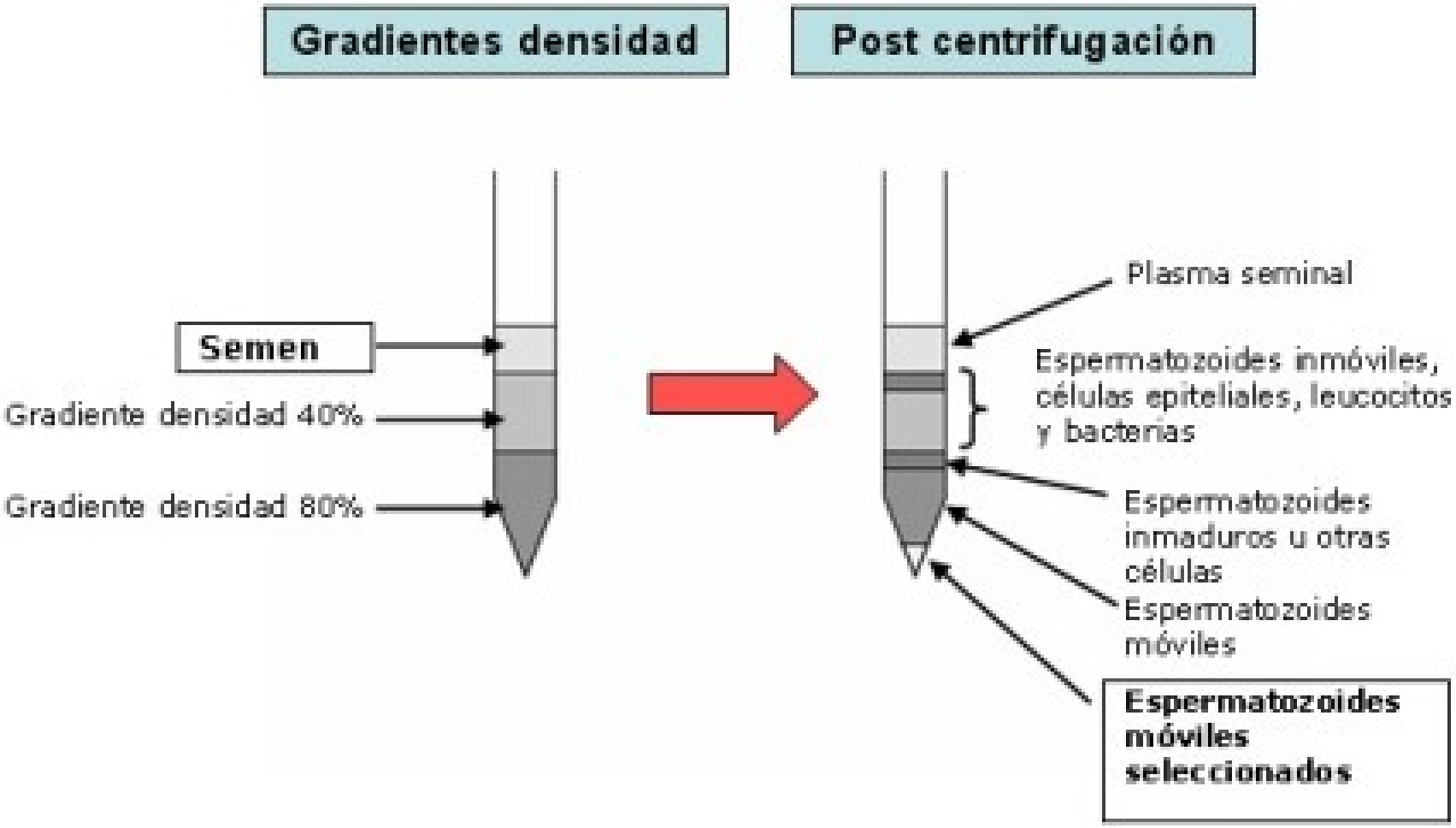
Centrifugar 1600 rpm, 15’



Recuperar pellet

Añadir medio fresco Centrifugar 2000rpm,5’

Eliminar sobrenadante


Gradientes densidad
Post centrifugación
Semen
Gradiente densidad 40%
Gradiente densidad 80%
Plasma seminal
Espermatozoides inmóviles, células epiteliales, leucocitos y bacterias
Espermatozoides inmaduros u otras células
Espermatozoides móviles
Espermatozoides móviles seleccionados

Capacitación espermática

- **Ventajas:**

Método de migración: **Swim-up**	Proceso más fisiológico La muestra capacitada suele quedar más limpia Es más independiente del volumen del eyaculado Se dispone de más tiempo libre
Método de centrifugación: **Gradiente de densidad**	Presenta mayor capacidad de recuperación Buenos resultados para muestras pobres o congeladas Requiere menos tiempo de realización

Fragmentación del DNA espermático

- Aproximadamente, un 15% de los varones estériles tienen un seminograma normal.
- Es posible los parámetros clásicos no sean del todo indicativos de la calidad del semen.
- Otros parámetros: integridad del acrosoma, vitalidad, evaluacion de actividad enzimáticas, integridad funcional de la membrana…
- Ningún parámetro tiene valor diagnóstico de la infertilidad.
- Integridad del DNA espermático es vital para el inicio del mantenimiento de un embarazo a término.
- En técnicas de reproducción asistida, la calidad de los espermatozoides requiere un control mucho más delicado.

Fragmentación del DNA espermático

- **Causas de las lesiones en el DNA espermático:**
  - **Intrínsecas:**
    - Selección ineficiente de los espermatozoides
    - Maduración incorrecta
  - **Extrínsecas:**
    - Daño inducido por quimio/radioterapia
    - Varicocele
    - Episodio de fiebre alta
    - Exposición a altas temperaturas
    - Enfermedad inflamatoria crónica o aguda
    - Estrés oxidativo post-testicular

Fragmentación del DNA espermático

- **Utilidad clínica:**

- Infertilidad de causa desconocida
- Fallos repetidos en técnicas de reproducción asistida
- Mala calidad embrionaria
- Abortos de repetición
- Varicocele
- Varones infértiles con edades superiores a 40 años
- Episodio febril en los últimos 3 meses

Fragmentación del DNA espermático

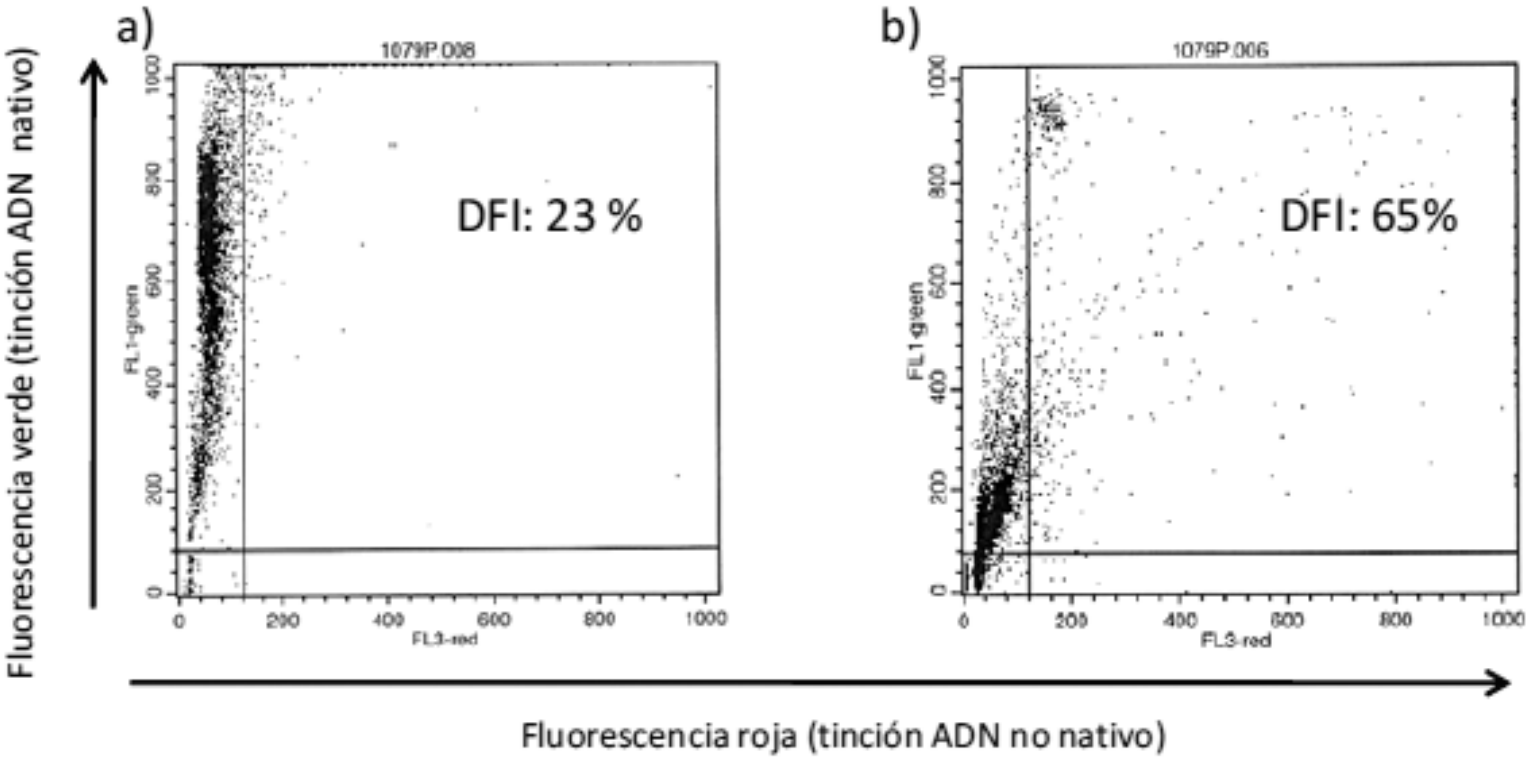
- **Métodos basados en:**

1) Marcar las roturas, tanto de cadena sencilla como de cadena doble en la molécula de ADN:

   TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling), ISNT (In situ Nick Translation)

2) Medir la distinta capacidad del DNA, para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos:

   SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), DBD-FISH (DNA Breakage Detection Fluoresce In situ Hybridation), SCD (Sperm Chromatin Dispersion)


a)
1079P.008
DFI: 23 %
FL1-green
FL3-red
b)
1079P.006
DFI: 65%
FL1-green
FL3-red
Fluorescencia verde (tinción ADN nativo)
Fluorescencia roja (tinción ADN no nativo)

GRACIAS