

BIOPSIA TESTICULAR

1. Preparación del material el día previo:

Preparar medio tamponado G-MOPS en 3 tubos llenos y 3 jeringas de 1ml. llenas hasta la mitad, por si se precisa realizar biopsia de epidídimo. Este medio se conserva en el frigorífico toda la noche. El día siguiente, antes de la biopsia se atempera en la estufa a 37°C.

2. Día de la biopsia:

Biopsia de epidídimo

- Cuando el urólogo lo solicite, se le entrega una jeringa en el quirófano.
- Esperar a que realice la biopsia y devuelva la jeringa con el medio.
- Depositar el medio de la jeringa en una placa de 35mm previamente atemperada.
- Expandir el medio por toda la superficie para poder observar mejor en el microscopio invertido, pero cuidar de que no se seque.
- Si se observan espermatozoides, avisar inmediatamente al urólogo para finalizar la biopsia.
- Pasar el medio con espermatozoides de la placa a un tubo falcon de 15mL.
- Este tubo se traslada a andrología y se realiza una centrifugación suave a 400rpm durante 4 min para eliminar los eritrocitos de la muestra.
- Se recoge el sobrenadante y se descarta el pellet.
- El sobrenadante se lava y capacita siguiendo el protocolo de capacitación espermática

Biopsia de testículo:

- En el momento del TESE el G-MOPS se vierte en placas de 35mm, en una cantidad suficiente para poder triturar el tejido sin que se seque pero sin poner medio en exceso para no diluir la muestra.
- Triturar la muestra con agujas de bisturí hasta que se forme una masa lo más homogénea posible.
- Observar bajo microscopio si hay espermatozoides
- Si se encuentran espermatozoides, avisar inmediatamente al urólogo para finalizar la biopsia.
- Pasar el medio con espermatozoides de la placa a un tubo Falcon de 15ml convenientemente rotulado.

- Este tubo se traslada al laboratorio de andrología y se realiza una centrifugación suave a 400rpm durante 4 min para eliminar los eritrocitos de la muestra.
- Se recoge el sobrenadante y se descarta el pellet.
- El sobrenadante se lava y capacita siguiendo el protocolo de capacitación espermática.

Estas muestras pueden ser congeladas siguiendo el protocolo de congelación de muestras de semen o pueden ser utilizadas en fresco para la ICSI.

Si no se encuentran espermatozoides móviles, se puede preparar una muestra añadiendo pentoxifilina 1:1.

Los datos obtenidos de la muestra se anotan en la hoja de ciclo o en la de congelación de muestras de semen (dependiendo del caso). Posteriormente los datos se pasan a la historia clínica en la base de datos informatizada.

3. Registros

- a. Documento "Hoja de congelación" (Anexo III): Se archiva en la carpeta "Semen congelado" que se encuentra en el área de gestión.
- b. Documento "Hoja de ciclo" (Anexo IV): Al finalizar el ciclo es archivada en la carpeta de Ciclos (cada carpeta con su año correspondiente) que se encuentra en el área de gestión.
- c. Historia clínica informatizada: Se anota el resultado del procedimiento en la historia clínica en el lugar correspondiente.

4. Anexos

Anexo I. Protocolos de Andrología.

Anexo III. Plantillas del Laboratorio de Andrología.

Anexo IV. Plantillas del Laboratorio de Embriología.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE PACIENTES CON EYACULACIÓN RETRÓGRADA

1. Procedimiento

- a. Alcalización de la muestra de orina: En los pacientes diagnosticados de eyaculación retrógrada, los espermatozoides no se encuentran en el eyaculado si no en la orina. Para garantizar la viabilidad de los espermatozoides presentes en la orina es necesario alcalinizar la muestra de orina del paciente. Para ello es necesario que el paciente tome bicarbonato sódico según indique el urólogo.
- b. Procesado de la muestra:
 - i. Se obtiene una primera muestra por eyaculación en un bote estéril convenientemente rotulado y después es necesario recoger una muestra de orina en otro bote estéril rotulado.
 - ii. Se valora el pH de la muestra de orina con tiras medidores de pH de rango 7,2-8. Sólo si la muestra está dentro del rango, las dosis ingeridas por el paciente fueron las adecuadas.
 - iii. Medir el volumen de la muestra de orina utilizando una pipeta graduada.
 - iv. Distribuir la muestra de orina en tubos Falcon de 15ml de fondo cónico.
 - v. Centrifugar 5 minutos a 2.400 rpm
 - vi. Desechar el sobrenadante de cada tubo por decantación.
 - vii. Resuspender el pellet de cada tubo en 0,5ml de medio IVF
 - viii. Agrupar el pellet resuspendido en uno o dos tubos Falcon de 15ml, utilizando una pipeta pasteur de plástico.
 - ix. Centrifugar de nuevo la muestra 5 min a 2.400rpm
 - x. Desechar el sobrenadante por decantación.
 - xi. Resuspender el pellet en 0,5ml de medio IVF.
 - xii. Realizar el análisis habitual del semen según lo descrito en el protocolo para seminogramas.

2. Registros

- a. Documento "Hoja de ciclo": Al finalizar el ciclo es archivada en la carpeta de Ciclos (cada carpeta con su año correspondiente) que se encuentra en el área de gestión.
- b. Historia clínica informatizada: Se hace una anotación con las características de la muestra y el resultado del proceso.

3. Anexos

Anexo III. Plantillas de Andrología

Anexo IV. Plantillas de Embriología

FRAGMENTACIÓN DE ADN

Método basado en la tecnología SCD (Sperm Chromatin Dispersion). Los espermatozoides frescos o descongelados se introducen en un gel de agarosa inerte en placas pretratadas. Un tratamiento inicial con ácido desnaturaliza el ADN en aquellos espermatozoides con el ADN fragmentado. A continuación la solución de lisis elimina la mayoría de proteínas nucleares, lo que provoca en las cadenas de ADN intactas unos halos grandes de ADN marcado. Por el contrario, los espermatozoides con el ADN fragmentado no muestran este halo o es muy pequeño.

Contenido del kit (contiene lo necesario para 10 determinaciones)

- SCS: 10 portaobjetos pretratados con agarosa.
- ACS: 10 tubos eppendorf conteniendo agarosa de bajo punto de fusión.
- AD: 1 tubo con solución de ácido desnaturalizante. 1ml.
- LS: Un bote de solución de lisis. 100 ml.

1. Procedimiento

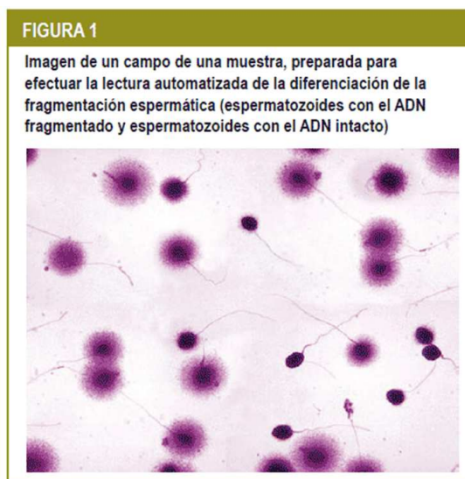
- 1) Mantener la solución de lisis (LS) a temperatura ambiente (22°C)
- 2) Atemperar un bote de plástico estéril (el utilizado normalmente para muestras de semen) con agua a 37°C en el incubador del laboratorio de andrología. Introducir una bandeja metálica en la nevera.
- 3) Diluir la muestra de semen en medio de cultivo/ diluyente de semen (IVF)/ PBS hasta alcanzar una concentración de 5×10^6 - 1×10^7 spz/mL.
- 4) Introducir un eppendorf de agarosa (ACS) en un corcho flotante (corcho rosa con forma de espermatozoide) en un tubo nuevo de plástico estéril con agua. El bote con el eppendorf lo introducimos en el microondas durante un minuto (o hasta que el agua comience su ebullición).
- 5) Transferir el eppendorf de agarosa con el corcho flotante, al bote con agua previamente atemperado en el incubador de andrología e incubar durante 5 min.
- 6) Añadir 25µL de muestra de semen al eppendorf de agarosa licuado.

Homogeneizar la muestra. Depositar un volumen de 14 a 20 µL de la mezcla obtenida sobre un portaobjetos pretratado de agarosa (SCS), depositar un cubreobjetos de 18x18mm sobre la muestra depositada evitando la formación de burbujas.

- 7) A partir de este momento, manejar el portaobjetos, siempre, en posición horizontal, para evitar derrames.
- 8) Depositar el portaobjetos sobre una superficie fría (bandeja metálica previamente introducida en la nevera), y mantenerlo en la nevera durante 5 min. para conseguir la gelificación de la agarosa.
- 9) Mientras, preparar la solución desnaturalizante (AD). Preparar la cabina para realizar los “baños” con 6 recipientes de incubación. Para ello, mezclar 80 µL de solución AD con 10 mL de agua destilada. Verter la mezcla sobre el primer recipiente de incubación.
- 10) Sacar el portaobjetos de la nevera y retirar el cubreobjetos con cuidado, evitando que la muestra gelificada se rompa. Es mejor retirarlo tirando de una esquina del cubre hacia fuera. A partir de este momento, usar guantes y manejar el portaobjetos horizontalmente con ayuda de pinzas.
- 11) Incubar el portaobjetos con la solución AD preparada en el paso 9) durante 7 min.
- 12) Después, verter 10 mL de la solución de lisis atemperada en el siguiente recipiente de incubación. Incubar el portaobjetos durante 25 min.
- 13) Incubar en un tercer recipiente, con un mínimo de 10 mL de agua destilada (o hasta que cubra el recipiente de incubación) para lavar la solución de lisis durante 5 min.
- 14) Finalmente, deshidratar la muestra incubándola durante 2 min en etanol al 70% (4º recipiente de incubación), etanol al 90% (5º recipiente de incubación) y etanol al 100% (6º recipiente de incubación) sucesivamente.
- 15) Dejar secar la preparación a temperatura ambiente.
- 16) Después de secar las preparaciones, pueden guardarse en cajas de portaobjetos durante meses.
- 17) Tinción “Diff.Quick”: Incubar la preparación en la solución de eosina de color rojo durante 6 min. Posteriormente, incubar la preparación en la solución de Azur B de color azul durante 6 min. Los soportes de incubación son 2 cajas de portaobjetos, una para cada color.

2. Clasificación de los espermatozoides según su aspecto:

- Espermatozoides sin ADN fragmentado: El espermatozoide presenta un halo grande o de tamaño medio a lo largo de su cabeza.
- Espermatozoides con ADN fragmentado: El espermatozoide presenta un halo pequeño o inexistente, el color de la cabeza es de un morado más intenso.



- Los datos y resultados de la muestra se anotan en la hoja informe de fragmentación y posteriormente los datos se pasan a la historia clínica en la base de datos informática.

3. Registros

- a. Documento “Hoja de informe de fragmentación”: Se rellena y se guarda en la carpeta de “Fragmentación” que se encuentra en el área de gestión.
- b. Historia clínica informatizada: Se apunta el resultado de la fragmentación y la recomendación en el caso que sea necesario.

4. Anexos

Anexo I. Protocolos de Andrología.

Anexo III. Plantillas del laboratorio de Andrología.

MACS

1. Pasos previos:

Previamente se debe informar al laboratorio de que se va a realizar un MACS para reservar una columna. El día anterior tenemos que preparar un tubo con medio IVF (protocolo de preparación del laboratorio).

2. Recogida y entrega de la muestra seminal: Se realiza siguiendo el protocolo de Seminograma.

3. Preparación de la muestra seminal:

- a. REM (recuperación de espermatozoides móviles): Se realiza un seminograma + Swim up como está descrito en el protocolo de seminogramas.
- b. MACS: El kit contiene lo necesario para 6 determinaciones: 6 botes con 0,15ml anticuerpo (Anexin-V kit reagent), 6 botes con 10 mL Binding Buffer y 6 columnas.

Además de estos fungibles, también se utilizan un imán y un soporte magnético. Todos los procesos del procedimiento se deben realizar en condiciones de esterilidad.

4. Procedimiento:

- a. Sacar el anticuerpo de la nevera para que esté a temperatura ambiente.
- b. El volumen obtenido de la REM se pone en un tubo de fondo redondo de 5ml.
- c. Si tenemos una concentración muy alta (más 10^7 a 10^8) podemos diluir utilizando el Binding Buffer o IVF.
- d. A la REM se le añaden 100 µl de anticuerpo.
- e. Añadir Binding Buffer hasta un volumen final de 500 µl.
- f. Mezclar e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- g. Colocar la columna MS en el imán fijo en el soporte metálico. Poner un tubo debajo de la columna.
- h. Lavar la columna con 1000 uL de Binding Buffer, descartar el buffer.
- i. Poner un nuevo tubo (previamente rotulado) debajo de la columna. Depositar la muestra en la columna. Recolectar el medio que fluye por la parte inferior de la columna en el tubo. Esta será la muestra de células purificadas, que se utilizará para las técnicas de FIV.
- j. Lavar la columna con 500 uL de Binding Buffer y recoger el flujo. Esta muestra también es de células purificadas y se puede juntar con la primera fracción.

Todos los datos de la muestra se anotan en la hoja de ciclo y posteriormente los datos se pasan a la historia clínica en la base de datos informática (Sara).

5. Registros

- Documento “Hoja de recogida de muestras”: Se archivan en la carpeta “Muestras de semen” que se encuentra en el área de gestión.
- Documento “Hoja de ciclo”: Al finalizar el ciclo es archivada en la carpeta de Ciclos (cada carpeta con su año correspondiente) que se encuentra en el área de gestión.
- Historia clínica informatizada: Se anotan los datos en su historia clínica.

6. Anexos

Anexo I. Protocolos de Andrología.

Anexo III. Plantillas del laboratorio de Andrología.