

Efecto de la aplicación de columnas de anexina en los resultados reproductivos de parejas infériles*

Gerardo Barroso Villa, ** Alinne Colín Valenzuela, ** Mario Morales Velázquez, ** Marcela Osuna Zazueta, ** Gonzalo Robledo Trejo, ** Rosaura Ávila Lombardo**

RESUMEN

Antecedentes: en técnicas de reproducción asistida la fertilización exitosa depende, principalmente, de la calidad de la membrana plasmática del espermatozoide. En pacientes que consultan por infertilidad se ha encontrado mayor número de anomalías en la membrana plasmática, como la translocación de fosfatidilserina, lo que evidencia eventos apoptóticos tempranos. Para que esta población "sana" pueda ser apta para fertilizar el gameto femenino se requieren técnicas que permitan seleccionar a los espermatozoides libres de daño apoptótico, como la "magnetic-activated cell sorting" (MACS).

Objetivo: comparar la selección espermática sólo mediante *swim up* o en combinación con la técnica de MACS-ANMB en pacientes infériles cuya muestra seminal se utilizó para técnica de reproducción asistida de alta complejidad (inyección intracitoplasmática ICSI), con la tasa de fertilización y desarrollo embrionario.

Material y método: estudio piloto realizado con 11 parejas en quienes la muestra seminal se dividió en dos grupos: (grupo A: seleccionada mediante *swim up*), (grupo B seleccionada por *swim up* y MACS). Con la población seminal obtenida se realizó ICSI y para cada grupo se evaluó la tasa de fertilización, desarrollo embrionario y fragmentación.

Resultados: el porcentaje de fertilización fue de 83.8 vs 93.9% para los grupos A y B, respectivamente; por lo que se refiere al número de blastómeras, fue de 2.6 y 2.8 y en cuanto al porcentaje de fragmentación en el día tres posterior a la fertilización de 7.19 vs 7.88% para los grupos A y B, respectivamente, sin alcanzar significación estadística.

Conclusiones: en la actualidad está claro que la selección espermática mediante MACS disminuye la población espermática con daño apoptótico temprano; sin embargo, es necesario realizar un estudio clínico para determinar diferencias significativas en la tasa de fertilización, desarrollo embrionario, tasa de implantación y tasa de embarazo.

Palabras clave: columnas de anexina, resultados reproductivos, parejas infériles.

ABSTRACT

Background: Successful fertilization in assisted reproductive technology depends mainly on the quality of sperm plasma membrane. In patients who consult for infertility has been found more abnormalities in the plasma membrane translocation of phosphatidylserine as, evidence of early apoptotic events. For this population, "healthy" may be apt to fertilize the female gamete requires techniques to select the free sperm apoptotic damage, such as the "magnetic-activated cell sorting" (MACS).

Objective: To compare sperm selection by swim-up only or in combination with MACS-technique in infertile patients ANMB whose semen sample was used for assisted reproduction technique of high complexity (intracytoplasmic sperm injection ICSI), with the rate of fertilization and embryonic development .

Material and methods: pilot study of 11 couples in whom the semen sample was divided into two groups: (group A: selected by swim-up), (group B selected by swim up and MACS). With the population obtained seminal ICSI was performed for each group was evaluated fertilization rate, embryo development and fragmentation.

Results: The fertilization rate was 83.8 vs 93.9% for groups A and B, respectively, for what concerns the number of blastomeres was 2.6 and 2.8 and in the percentage of fragmentation on day three after fertilization of 7.19 vs. 7.88% for groups A and B, respectively, without reaching statistical significance.

Conclusions: It is now clear that sperm selection by MACS decreases the sperm population with early apoptotic damage, however, it is necessary to conduct a clinical trial to determine significant differences in fertilization rate, embryo development, implantation rate and rate of pregnancy.

Key words: annexin columns, reproductive outcomes, infertile couples.

RÉSUMÉ

Antécédents : fécondation réussie dans les technologies de reproduction assistée dépend principalement de la qualité de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Chez les patients qui consultent pour infertilité a été trouvé plusieurs anomalies dans la translocation de la membrane plasmique

phosphatidylserine comme preuve de début des événements apoptotiques. Pour cette population, «sains» peuvent être aptes à féconder le gamète femelle exige des techniques pour sélectionner les dégâts du sperme gratuitement apoptotiques, tels que le «tri cellulaire magnétique activée» (MACS). **Objectif:** Comparer la sélection de spermatozoïdes par *swim-up* seul ou en combinaison avec MACS-technique dans ANMB patients infertiles dont le sperme de l'échantillon a été utilisé pour la technique de reproduction assistée d'une grande complexité (injection de sperme intra-cytoplasmique ICSI), avec le taux de fécondation et développement embryonnaire.

Matériel et méthodes: étude pilote de 11 couples dans lesquels l'échantillon de sperme a été divisé en deux groupes: (groupe A: sélectionné par *swim-up*), (groupe B sélectionnés par nager et MACS). Avec la population obtenue ICSI séminale a été réalisée pour chacun des groupes a été évaluée taux de fécondation, le développement embryonnaire et la fragmentation.

Résultats: Le taux de fécondation était de 83,8 vs 93,9% pour les groupes A et B, respectivement, pour ce qui concerne le nombre de blastomères a été de 2,6 et 2,8 et le pourcentage de fragmentation sur trois jours après la fécondation de 7,19 vs 7,88% pour les groupes A et B, respectivement, sans atteindre une signification statistique.

Conclusions: Il est maintenant clair que la sélection de spermatozoïdes par MACS diminue la population de spermatozoïdes avec des dommages apoptotique précoce, cependant, il est nécessaire de mener un essai clinique pour déterminer des différences significatives dans le taux de fécondation, le développement embryonnaire, taux d'implantation et le taux de grossesse.

Mots-clés: colonnes annexine, les résultats de reproduction, les couples infertiles.

RESUMO

Antecedentes: a fertilização bem sucedida na tecnologia de reprodução assistida depende principalmente da qualidade da membrana plasmática de espermatozóides. Em pacientes que consultam para infertilidade foi encontrado anormalidades mais na translocação membrana plasmática de fosfatidilserina como, a evidência dos primeiros eventos apoptóticos. Para esta população, “saudável” pode ser aptos a fertilizar o gameta feminino requer técnicas para selecionar a danificar o esperma livre apoptóticos, como a “separação de células magnético ativado” (MACS).

Objetivo: comparar a seleção de espermatozóides por *swim-up* só ou em combinação com MACS técnica em pacientes inférteis ANMB cujo sémen amostra foi utilizada para a técnica de reprodução assistida de alta complexidade (injeção intracitoplasmática de espermatozóides ICSI), com a taxa de fecundação e desenvolvimento embrionário.

Material e métodos: estudo piloto de 11 casais nos quais a amostra de sêmen foi dividido em dois grupos: (grupo A: selecionados por *swim-up*), (grupo B selecionados por *swim-up* e MACS). Com a população obtida ICSI seminal foi realizada para cada grupo foi avaliada a taxa de fertilização, desenvolvimento embrionário e fragmentação.

Resultados: A taxa de fertilização foi de 83,8 vs 93,9% para os grupos A e B, respectivamente, para o que diz respeito ao número de blastômeros foi de 2,6 e 2,8 e na percentagem de fragmentação no terceiro dia após a fertilização de 7,19 vs 7,88% para os grupos A e B, respectivamente, sem alcançar significância estatística.

Conclusões: É agora claro que a seleção de espermatozóides por MACS diminui a população de espermatozóides com danos apoptóticas cedo, no entanto, é necessário realizar um ensaio clínico para determinar diferenças significativas na taxa de fertilização, desenvolvimento embrionário, a taxa de implantação e taxa de gravidez.

Palavras-chave: colunas de annexine, desempenho reprodutivo, os casais inférteis.

* La FEMECOG otorgó a este trabajo el tercer lugar del Premio Dr. Alfonso Álvarez Bravo en la categoría de investigación básica del concurso celebrado durante el 62 Congreso Mexicano de Ginecología que tuvo lugar en el puerto de Veracruz el pasado octubre de 2011.

** Centro de Reproducción Arcos, NASCERE, México, DF.

Correspondencia: Dr. Alinne Colín Valenzuela, Centro de Reproducción Arcos, NASCERE, Tamarindos 90 Torre 1, piso 2, Bosques de las Lomas. Cuajimalpa 05120, México DF. Correo electrónico: alinnecolin@gmail.com

Recibido: julio 2011. Aceptado: noviembre 2011.

Este artículo debe citarse como: Barroso-Villa G, Colín-Valenzuela A, Morales-Velázquez M, Osuna-Zazueta M, Robledo-Trejo G, Ávila-Lombardo R. Efecto de la aplicación de columnas de annexina en los resultados reproductivos de parejas infériles. Ginecol Obstet Mex 2012;80(1):16-21.

El gameto masculino tiene un papel importante en los procesos reproductivos, no sólo en la aportación de material genético sino también en el desarrollo embrionario temprano y tardío. El semen de individuos infériles tiene múltiples defectos estructurales y funcionales, como: alteraciones nucleares, incluida la cromatina anormal, cromosomas con microdelecciones, aneuploidías y fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Por esto se le ha dado mayor atención a las nuevas técnicas para identificar la integridad del gameto masculino en las parejas que asisten por infertilidad en busca de reproducción asistida.¹

Las nuevas técnicas de reproducción son decisivas en el tratamiento de parejas que consultan por infertilidad; sin

embargo, las tasas de éxito de estos métodos siguen siendo subóptimas y uno de los factores relacionados con ello es la calidad del semen. El éxito de los nuevos métodos de micromanipulación, como la inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI) utilizada como un complemento en la fertilización *in vitro* y en la terapia de transferencia de embriones, ha incrementado las posibilidades de procreación de la pareja infértil con problemas en la calidad seminal (por ejemplo, teratozoospermia, astenozoospermia y oligozoospermia). Se ha observado cierta limitación en la aplicación de esa técnica porque el ICSI no garantiza la inyección de un espermatozoide “sano”, a pesar de su aspecto morfológico, debido a que con esta tecnología reproductiva de alto impacto se han eliminado numerosas barreras naturales en la selección espermática, necesaria para la elección de células morfológica y funcionalmente superiores para la reproducción.

A pesar del éxito de las técnicas de micromanipulación espermática se ha observado que en poblaciones de sujetos con alteraciones moderadas y severas en la función espermática, se heredan trastornos relacionados con las microdelecciones del cromosoma Y, vinculadas con daño en la movilidad, y se han relacionado directamente con algún grado de infertilidad en la progenie, incluso hasta en 10% de los casos.

Los eventos relacionados con los mecanismos de muerte celular programada en espermatozoides de sujetos infériles se han definido perfectamente, lo mismo que los procesos de disfunción embrionaria, alteraciones del aparato mitótico, arresto embrionario, defectos en la implantación, y los relacionados con la placentación que conducen al nacimiento de niños de bajo peso al nacimiento por disfunción placentaria, restricción del crecimiento intrauterino, hipertensión relacionada con el embarazo o preeclampsia vinculados con la deficiencia en la angiogénesis, además de incremento en la tasa de aborto por eventos trombóticos y prematuros.²

La fertilización exitosa con técnicas de reproducción asistida depende, principalmente, de la calidad de la membrana plasmática del espermatozoide, que requiere integridad y funcionamiento normal para proveer al espermatozoide: movilidad, reacción acrosómica y potencial de fertilización. En pacientes infériles se encuentra mayor número de anomalías en la membrana plasmática, como la translocación de fosfatidilserina de la capa interna a la capa externa de la membrana plasmática, lo que indica que

hubo eventos apoptóticos tempranos, en comparación con los sujetos con fertilidad probada.^{2,3,4}

El análisis de parámetros seminales convencionales (OMS, 2010) incluye: la evaluación de la concentración espermática, movilidad, morfología y viabilidad,⁵ sin embargo, no permite evaluar la apoptosis en espermatozoides maduros cuyo papel en las bajas tasas de fertilización e implantación en técnicas de reproducción asistida ha sido demostrado. Para mejorar los resultados en técnicas de reproducción asistida se ha recurrido a numerosas técnicas de preparación espermática; sin embargo, esas técnicas han fallado en la identificación de eventos moleculares, como la apoptosis.

Para evaluar la expresión de la apoptosis en el espermatozoide existen diferentes técnicas: las que detectan el proceso apoptótico en etapas tempranas y las que lo detectan en etapas tardías. Entre los métodos de detección temprana de apoptosis está la identificación de la fosfatidilserina mediante la adición de anexina V (AN-V), que es una proteína con afinidad por los fosfolípidos dependiente de calcio, con alta afinidad por la fosfatidilserina. La unión de la anexina V a las células apoptóticas puede detectarse mediante una tinción verde fluorescente con isotiocianato de fluoresceína (FITC) que puede detectarse mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Otra forma de detectar el proceso de apoptosis en etapas tempranas es mediante la detección de proteasas específicas de cisteína-aspartato (caspasas).^{6,7,8}

Con el propósito de seleccionar mejores poblaciones espermáticas se han desarrollado nuevas alternativas diagnósticas, como la selección de células por microesferas magnéticas o MACS por sus siglas en inglés (“*Magnetic-activated cell sorting*”), que es una técnica de preparación espermática que utiliza microesferas superparamagnéticas conjugadas con anexina V para separar poblaciones espermáticas apoptóticas (AN-V positivas) de las no apoptóticas. Con base en esto puede utilizarse esta técnica para identificar poblaciones espermáticas de baja calidad funcional o reproductiva cuando los parámetros espermáticos aparentemente son normales.⁹

La utilización de esta nueva técnica de preparación espermática ha demostrado la separación de poblaciones espermáticas superiores en movilidad, viabilidad y morfología normal, además de mayor tolerancia a la criopreservación y descongelamiento, con mayor potencial de fertilización.¹⁰ La selección de células por

microesferas magnéticas en preparación espermática es una técnica sencilla y rápida que mejora los parámetros espermáticos clásicos y disminuye los marcadores apoptósicos. Por esta razón, este método puede complementar a otras técnicas de preparación espermática para obtener poblaciones espermáticas con capacidades reproductivas superiores e incrementar las tasas de éxito en técnicas de reproducción asistida. Por lo anterior vimos la necesidad de realizar un estudio para determinar cuál es el efecto en la tasa de fertilización y desarrollo embrionario con el uso de dos técnicas distintas de preparación espermática: la técnica convencional de *Swim-up* únicamente y *Swim-up* complementado con MACS, en parejas infériles a quienes se realizan ciclos de ICSI.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio piloto realizado con 11 parejas en quienes la muestra seminal se dividió en dos grupos: A seleccionada mediante *swim up* y grupo B seleccionada por *swim up* y MACS. Con la muestra seminal obtenida se realizó ICSI y para cada grupo se evaluó: *a*) el porcentaje de fertilización, *b*) número de blastómeras y *3*) porcentaje de fragmentación embrionaria.

Para la evaluación de los resultados se utilizó el programa SPSS 16; para la distribución de los datos se empleó la estadística paramétrica y las variables se compararon con la prueba de la T de Student.

Los pacientes recolectaron una muestra de semen en contenedores estériles después de 3 a 5 días de abstinencia sexual. La evaluación de los parámetros seminales fue de: concentración, movilidad y morfología. Después de la licuefacción (30-45 minutos) se colocaron 5 μ L de cada muestra en una cámara de Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) y en un microscopio de luz se observaron la movilidad y concentración espermática. La morfología se evaluó de acuerdo con los criterios estrictos de Kruger. Cada muestra (10 μ L) se extendió en un portaobjetos y se dejó secar durante 20 minutos antes de prepararse con la tinción Diff-Quick (Baxter Dade Diagnostics, Dubingen, Switzerland). Se leyeron, en promedio, 100 espermatozoides por extendido en microscopía de luz, en un objetivo de inmersión 100 X.

Técnica swim up y MACS. Después de la licuefacción la muestra espermática se lavó con HTF-modificado

(HTF-M) (Irvine Scientific) y se agregó 10% de suero sintético sustituible (SSS) (Irvine Scientific) durante 10 minutos a 1,220 rpm y suspendida en 0.5 mL de HTF-M más suero sintético sustituible para aplicar la técnica de *swim-up*. La muestra que se obtuvo después del *swim-up* se dividió en dos fracciones. A una fracción se le realizó la selección magnética y los espermatozoides se incubaron con microesferas de anexina-V conjugada (Miltenyi Biotec, GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) durante 20 minutos a temperatura ambiente; por cada 10 millones de espermatozoides se usaron 1000 μ L de microesferas. La suspensión de los espermatozoides con microesferas se cargó en la columna de separación después de que ésta se lavó con *buffer*. La fracción retenida en la columna contenía los espermatozoides que habían iniciado un proceso de apoptosis. La fracción con membranas intactas se recolectó y resuspendió en medio de IVC-ONE (*in vitro care*) y posteriormente se utilizó en la ICSI.

Selección de óvulos para la ICSI: previo a la ICSI, los óvulos se denudaron con hialuronidasa (In Vitro Care) y se caracterizaron en sus diferentes estadios. Los óvulos en metafase II se inyectaron dos horas después de la denudación, mediante el auxilio de un microscopio invertido IX81 (Olympus Corporation Shibuya-ku, Tokyo, Japan).

Selección de óvulos para MAC'S y para Swim-up: los óvulos en metafase II obtenidos de cada paciente se dividieron de tal manera que un porcentaje de éstos se inyectó con espermatozoides obtenidos por MAC'S y otro con espermatozoides obtenidos del *Swim-up*. Los óvulos inyectados se colocaron en medio IVC-ONE (*in vitro care*) y secuenciaron con medios IVC-TWO (*in vitro care*) y IVC-THREE (*in vitro care*) hasta el día cinco de desarrollo. Los óvulos fertilizados se evaluaron morfológicamente después de 16-18, a las 42, 72, 92 y 116 horas posteriores a la fertilización.

RESULTADOS

La edad promedio del factor femenino fue de 32.5 ± 3.3 años, todas con un factor endocrino ovárico leve y en control (por ejemplo, hipotiroidismo, hiperprolactinemia). La estimulación ovárica se realizó con menotropinas y el disparo con HGC recombinante en el día 12 del ciclo. En todas las pacientes se utilizó el protocolo fijo con antagonista de la GnRH y la captura ovular se realizó con un estradiol pico promedio de 2800 pg por mL.

Por lo que se refiere al factor masculino, la edad promedio fue de 36 ± 5.5 años de edad, todos con algún grado de oligo, terato o astenozoospermia. De los oocitos obtenidos, 92% se encontraban en MII. Se destinaron 64 oocitos para fertilización con la técnica habitual de *swim up* y 46 para la técnica de *swim up* más MACS. El porcentaje de fertilización fue de 83.8 vs 93.9% para los grupos A y B, respectivamente (Figura 1), sin alcanzar significación estadística.

También se evaluó el número de blastómeras en el día dos de los óvulos fertilizados y se observaron 2.6 vs 2.8 para *swim up* y *swim up* más MACS, respectivamente.

Se evaluó el porcentaje de fragmentación en el día 3 de desarrollo posterior a la fertilización, con los hallazgos de, en promedio, 7.19 vs 7.88% para *swim up* y *swim up* más MACS, respectivamente, sin considerarse estadísticamente significativo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En la actualidad es indiscutible el papel del espermatozoide en la fertilización y está claramente establecida la susceptibilidad de esta célula a procesos apoptóticos que pueden identificarse mediante técnicas establecidas y ampliamente validadas; sin embargo, ninguna de ellas permite la selección de una población espermática que pueda utilizarse clínicamente.¹²

En los últimos años y derivado de su utilización en otras áreas de la Medicina, se desarrolló el método de MACS para poder seleccionar población espermática susceptible de ser utilizada clínicamente.⁶ En la bibliografía se encuentran diversos trabajos que demuestran que con esta técnica mejora la evaluación de los parámetros seminales convencionales.^{4,5} En este trabajo se aplicó exitosamente esa técnica, de modo que los espermatozoides obtenidos se utilizaron para la ICSI, con una fertilización exitosa y en porcentaje mayor en relación con la aplicación sólo de *swim up*; sin embargo, es necesario ampliar la muestra para poder demostrar una diferencia estadísticamente significativa respecto a otras variables a evaluar (por ejemplo, desarrollo embrionario, embarazo, etc...). Se requiere un método estricto porque son múltiples los factores (edad de la pareja, calidad ovocitaria, tabaquismo, etc...) que pueden afectar el resultado reproductivo de las parejas que reciben técnicas de reproducción asistida.

Con los resultados evaluados puede concluirse que la técnica de MACS-ANMB es una alternativa útil para la selección espermática, que logra mayor porcentaje de fertilización en parejas que reciben técnicas avanzadas en reproducción y que serán objeto de ICSI; sin embargo, es necesario seguir evaluando los resultados de ésta en cuanto a desarrollo embrionario y en el logro de mejor resultado con respecto a la implantación embrionaria y tasa de embarazo clínico.

REFERENCIAS

1. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988;49:112-117.
2. Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril* 2009;92(3):835-848.
3. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, et al. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online* 2005;10(6):740-746.
4. Said TM, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, et al. Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod Biomed Online* 2006;13(3):336-339.
5. Grunewald S, Paasch U, Said TM, Rasch M, et al. Magnetic-activated cell sorting before cryopreservation preserves mitochondrial integrity in human spermatozoa. *Cell Tissue Bank* 2006;7(2):99-104.
6. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Switzerland, 2010.

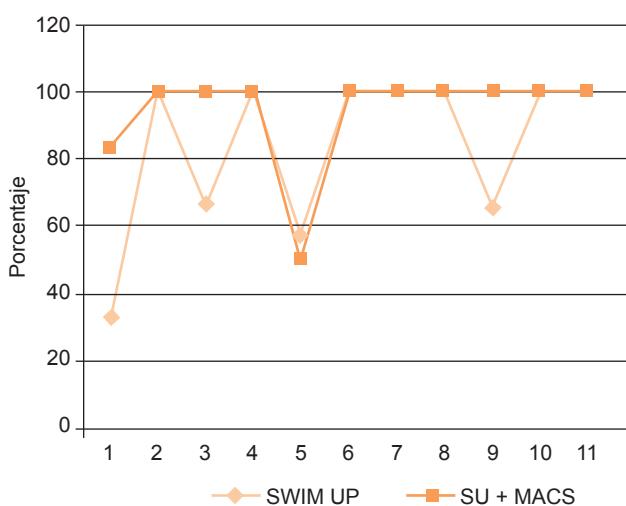


Figura 1. Porcentaje de fertilización.

7. Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander HJ. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 2003;24(2):246-252.
8. Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, Said TM, et al. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil Steril* 2009;92(2):572-577.
9. Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 2006;74(3):530-535.
10. Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, et al. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 2008;29(2):134-142.
11. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Rasch M, et al. Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertil Steril* 2005;83(5):1442-1446.
12. Colin A, Gomez-López N, Durán H, Barroso G, Oehninger S. The effect of age on the expression of apoptosis biomarkers in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2011;94:2609-2614.