

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**“Selección espermática mediante separación
magnética”**

TRABAJO FIN DE MÁSTER POR

ESTHER PÉREZ GONZÁLEZ

JUNIO 2013

LAURA PEINADO ADIEGO, embrióloga de la Unidad de Reproducción Asistida de la
Clínica Ginecológica Recoletos de Valladolid

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por DÑA. ESTHER PÉREZ GONZÁLEZ, titulado
“**SELECCIÓN ESPERMÁTICA MEDIANTE SEPARACIÓN MAGNÉTICA**”
realizado bajo la dirección de Laura Peinado Adiego, dentro del programa de Máster en
“Biología y Tecnología de la Reproducción”, reúne a su juicio las condiciones
necesarias para ser admitido como Trabajo Fin de Máster.

Y para que así conste dónde convenga, firma la presente certificación

En VALLADOLID a 7 de junio de 2013

 **RECOLETOS**
POLICLÍNICAS
Acera de Recoletos, 12 - 47004 Valladolid
C.I.F. B-47408208



Fdo.: Laura Peinado Adiego

LISTADO DE SIGLAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ASEBIR: Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción

Ca⁺²: catión calcio

CO₂: dióxido de carbono

COLS: Colaboradores

D+2: día 2 de desarrollo embrionario

D+3: día 3 de desarrollo embrionario

FIV: fecundación *in vitro*

βhCG: subunidad β de la gonadotropina coriónica

IAC: inseminación artificial cónyuge

ICMART: Comité Internacional para la Supervisión de Técnicas de Reproducción Asistida.

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoide

MACS: separación celular por activación magnética

OMS: Organización Mundial de la Salud

PS: fosfatidilserina

PVP: polivinilpirrolidona

ROS: especies reactivas del oxígeno

RPM: revoluciones por minuto

TE: transferencia embrionaria

TRA: técnicas de reproducción asistida

VG: vesícula germinal

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
a) Obtención de las muestras seminales.....	9
b) Procesamiento de las muestras seminales.....	9
c) Inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).....	10
d) Valoración de la fertilización y de la calidad embrionaria.....	11
d) Transferencia embrionaria.....	12
e) Diagnóstico del embarazo y evolución.....	12
f) Casos clínicos.....	12
4. RESULTADOS.....	13
5. DISCUSIÓN.....	23
6. CONCLUSIONES.....	26
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	27
8. BIBLIOGRAFÍA.....	28

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Comité Internacional para la Supervisión de Técnicas de Reproducción Asistida (ICMART) definen el término infertilidad como una enfermedad del sistema reproductor que conlleva la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de doce meses o más, de relaciones sexuales sin protección regular (Zegers-Hochschild y cols., 2009). Esta condición afecta alrededor del 8%-12% de las parejas en edad reproductiva y aunque a menudo se percibe como un trastorno femenino, se piensa que la infertilidad masculina podría ser responsable aproximadamente del 30%-35% de los casos (Tapia, 2012; Brookings y cols., 2013;).

La reproducción asistida y el conjunto de técnicas asociadas a ella, ayudan a la reproducción humana en los casos con problemas de infertilidad. Estos tratamientos dan solución a la mayoría de los casos de infertilidad masculina y femenina (Makker y cols., 2008).

Sin lugar a dudas la inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) fue la aportación más revolucionaria en este campo, tras el nacimiento del primer niño por esta técnica en 1992 (Palermo y cols., 1992). La ICSI, es a fecha de hoy, el tratamiento gracias al cual se solventan la mayoría de los casos graves de infertilidad masculina, y las indicaciones para este procedimiento se están expandiendo cada vez más (Grunewald y Paasch, 2013). Se ha demostrado que para que haya éxito en la fecundación, tras la aplicación de esta técnica, se requiere el uso de un espermatozoide que funcione de forma normal y que además presente integridad en su membrana (Flesch y Gadella, 2000).

Sin embargo, y a pesar de los avances conseguidos, la tasa de éxito de las técnicas de reproducción asistida (TRA) continúa siendo más baja de lo esperado. ¿A qué se debe?, ¿Se pueden mejorar estos resultados de alguna forma? Como ya hemos dicho anteriormente, uno de los factores que determina el éxito en estas técnicas es la calidad del espermatozoide (Ombelet y cols., 2003), así que dado el incremento de la demanda de las TRA, junto con su no tan óptimo resultado, ha propiciado el desarrollo de una técnica

ideal para la preparación del espermatozoide, que pueda cumplimentar estas aplicaciones (Makker y cols., 2008).

En la eyaculación, decenas de millones de espermatozoides son depositados por el varón en la parte superior de la vagina, cerca del orificio cervical desde donde comienzan su viaje, con una carrera competitiva, a través del tracto genital de la mujer para tratar de alcanzar y fecundar el ovocito en la ampolla de la trompa de Falopio. En los humanos, con respecto al número total de espermatozoides eyaculados, sólo alrededor del 10% entrará en el cuello uterino, 1% en el útero y 0,1% en la trompa de Falopio. Finalmente, de los 10^2 a 10^3 espermatozoides que alcanzarán el complejo cúmulo-ovocito, sólo un espermatozoide fecundará el huevo. De lo cual se deduce que hay un estricto proceso de selección de los espermatozoides, que es esencial para la fecundación, y que el tracto genital femenino está involucrado (figura 1).

Por tanto, observando lo que ocurre de forma natural en el interior del tracto femenino, se han desarrollado estrategias de separación del espermatozoide, que están basadas principalmente en procesos de motilidad, adhesión y filtración (Henkel, 2012).

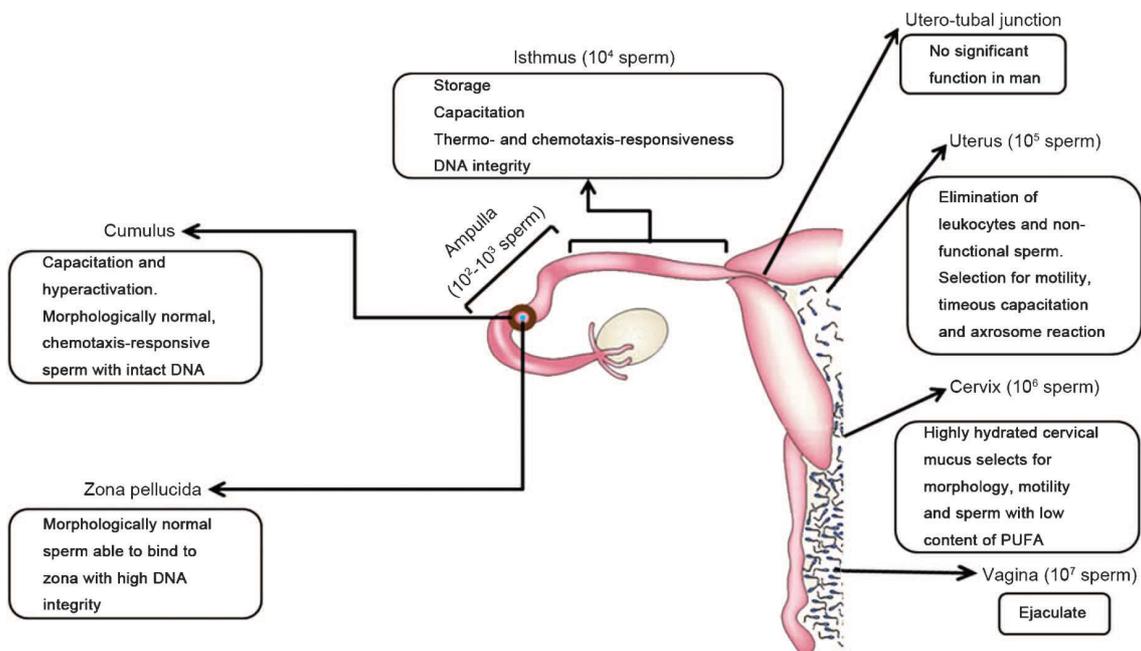


Figura 1. Lugares de selección espermática dentro del tracto reproductivo femenino (Henkel 2012)

La técnica ideal para la separación de espermatozoides debe ser rápida, fácil y rentable. Debe aislar tantos espermatozoides móviles como sea posible, no causar daños en el espermatozoide, ni alteraciones fisiológicas y además, debe eliminar los espermatozoides muertos y otras células, incluyendo leucocitos y bacterias. También debe eliminar tóxicos, sustancias incapacitantes o especies reactivas del oxígeno (ROS), que causarían un daño oxidativo muy importante. Por último, debe permitir el procesamiento de grandes volúmenes de eyaculados (Henkel y Schill, 2003).

Mientras que en los primeros años el enfoque para TRA se basaba en la obtención de espermatozoides móviles, en los últimos años, la atención se centró en el aislamiento de los espermatozoides funcionales, un requisito dictado por las observaciones de los resultados de la fecundación *in vitro* (FIV). Por tanto, las técnicas convencionales de separación de espermatozoides muestran limitaciones, ya que éstas no seleccionan espermatozoides basándose en la competencia funcional o en la calidad genética, como se puede observar que ocurre en un proceso *in vivo* dentro del tracto genital femenino (Henkel, 2012).

En la mayoría de los laboratorios de reproducción asistida las dos técnicas usadas por excelencia para la separación espermática, son *el swim up* y los gradientes de densidad.

La técnica del *swim up*, originalmente descrita por Mahadevan y Baker a partir de un sedimento lavado, es la más antigua, y es el método más utilizado para la separación de espermatozoides. Se basa en la selección de espermatozoides por su movilidad (Molina, 2012). Es la técnica estándar para los pacientes con normozoospermia y para casos de infertilidad femenina. Cuando este método de selección era usado para preparar el espermatozoide en una inseminación, se conseguían excelentes tasas de fecundación. Sin embargo, con la llegada de la FIV, *el swim up*, ya no sólo se usaba para dar solución al factor tubárico, sino que también se amplió a parejas con infertilidad idiopática y, en última instancia, a los casos con factor masculino, debido a los cuales, el problema de fertilidad masculina se hizo evidente (Jameel, 2008).

Los gradientes de densidad disgregan las partículas en función de su densidad. Los diferentes componentes se separan hasta alcanzar una posición en la que su densidad sea igual a la de su entorno (situación de flotabilidad neutra), donde ya no se

desplazan más. Los espermatozoides maduros son células compactadas y alcanzan el gradiente de mayor densidad. El plasma seminal permanece flotando sobre el gradiente de menor densidad. Las células, los espermatozoides inmaduros y muertos se sitúan en la interfase entre los dos gradientes (Sánchez y col., 2009).

A pesar de que estas dos técnicas son eficaces en la separación espermática, y que junto con los análisis convencionales se aporta considerable información acerca de las características de la muestra seminal, no consiguen dar información acerca de la presencia de eventos de muerte celular programada (apoptosis) que pueden ser en gran medida, responsables de una baja tasa de fecundación, implantación y desarrollo embrionario (Boe-Hansen y cols., 2006; Avendaño y cols., 2008). Se ha demostrado que esta apoptosis guarda relación con la fragmentación del ADN (Uriondo y cols., 2011) y por tanto, la integridad del ADN es un factor paterno que cobra gran importancia (Rawe y cols., 2010). Los espermatozoides con defectos genéticos (mayor incidencia en fragmentación de ADN) están directamente asociados con la infertilidad. (Gil y cols., 2013).

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico de crítica importancia para el ser humano, implica el suicidio de la célula sin provocar una respuesta inflamatoria (Diricam y cols., 2008). En el sistema reproductor masculino, se encarga de frenar la superproducción de espermatozoides y supone un apoyo para las células de sertoli. El proceso de apoptosis se caracteriza por una serie de cambios estereotípicos, que incluyen contracción celular, rotura de la membrana plasmática, externalización de fosfatidilserina, condensación de cromatina y fragmentación. La no regulación del proceso está implicada en la patogénesis de la infertilidad masculina. Todo esto puede conducir al fracaso de las TRA, a pesar del continuo uso de espermatozoides morfológicamente normales y con buena motilidad (Makker y cols., 2008). La no eliminación de espermatozoides apoptóticos durante la espermatogénesis puede ser la razón de su presencia en el semen (Said y cols., 2006a; Makker y cols., 2008). En los espermatozoides eyaculados por el hombre se pueden identificar características típicas de apoptosis, como puede ser la externalización de fosfatidilserina, la activación de la caspasa 3, la disminución del potencial de membrana mitocondrial y la fragmentación del ADN (Makker y cols., 2008; De Vantéry y cols., 2009). Habitualmente se utilizan numerosos test para analizar la fragmentación del

ADN espermático, sin embargo surge una gran controversia respecto a su uso en las TRA, ya que éstos sólo detectan marcadores apoptóticos tardíos, y no permiten la detección de marcadores tempranos, que aportarían una información más completa acerca del proceso apoptótico (Gil y cols., 2013).

La membrana plasmática es una de las estructuras clave en los espermatozoides, ya que puede presentar características apoptóticas en los hombres infértiles (Glander y Schaller, 1999). Durante la apoptosis temprana, se modifican las funciones normales de la membrana, principalmente las asociadas con la asimetría de los fosfolípidos y los cambios en la composición lipídica (Schiller y cols., 2000). La fosfatidilserina (PS), que es un fosfolípido presente normalmente en la cara interna de la membrana plasmática, de carga molecular negativa, se traslada a la cara externa (Makker y cols., 2008). La externalización de PS es actualmente aceptada como un marcador para la detección de apoptosis temprana (Said y cols., 2010). Los espermatozoides maduros, muestran una menor incidencia de la apoptosis. La asociación de la externalización de PS con un índice alto de tinción del ADN en muestras de semen humano, indica que la apoptosis temprana se asocia con el desarrollo inmaduro del núcleo y con la cromatina anormal (Diricam y cols., 2008), lo que podría comprometer el desarrollo de las TRA.

Hay varios factores que pueden conducir a la inducción de la apoptosis en los espermatozoides humanos. Uno de ellos es la alta concentración de las ROS. Cuando las concentraciones de los enzimas antioxidantes disminuyen, y la concentración de ROS se ve incrementada, el efecto ROS abrumba la célula y la conduce a la apoptosis (Wang y cols., 2003).

Teniendo en cuenta la importancia del estudio de la fragmentación del ADN espermático junto con los marcadores de apoptosis celular, surge la pregunta acerca de las opciones terapéuticas ante la presencia de un alto porcentaje de espermatozoides afectados. Algunos autores consideran beneficioso el uso de antioxidantes 2 o 3 meses antes previo al uso de los TRA (Greco y cols., 2005). El tratamiento con antioxidantes en pacientes con daño en el ADN espermático antes de las TRA mejora el pronóstico reproductivo. Aunque hay contradicciones al respecto, ya que, otros autores afirman que el uso de antioxidantes no mejora los resultados del tratamiento de TRA y que se deben

considerar las causas que originan la ruptura del ADN espermático (Martin-Du y Sakkas, 1998; Bolle y cols., 2002).

Otra posible opción terapéutica a la presencia de un elevado porcentaje de espermatozoides apoptóticos en el eyaculado, es la realización de una biopsia de testículo, ya que se postula que la tasa de fragmentación del ADN espermático es marcadamente menor en el testículo si se la compara con el eyaculado (Greco y cols., 2005). Los autores concluyen que la biopsia de testículo para su uso en TRA constituye un modo de omitir el paso por el epidídimo (lugar donde ocurre el mayor daño en el núcleo del espermatozoide) (Ramos y cols., 2004) y es la primera opción en el tratamiento del factor masculino con altos niveles de fragmentación del ADN espermático.

En búsqueda de un método no invasivo que permita dar solución a los altos niveles de apoptosis celular en espermatozoides, distintos grupos de trabajo describieron el uso de anexina V acoplada a pequeñas esferas metálicas (~50 nm de diámetro) recubiertas por un polímero biodegradable. Las mismas pueden ser usadas para separar espermatozoides muertos y apoptóticos cuando se los expone a un campo magnético de alto poder en una columna. Este procedimiento de separación o filtrado molecular se denomina *Magnetic-Activated Cell Sorting* (MACS) o separación magnética por columnas de anexina V (Rawe y cols., 2009).

La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos con un peso molecular de 35 kDa. Se trata de un componente importante de la membrana de los macrófagos y otros tipos de células fagocíticas. Presenta una elevada afinidad por la PS en presencia de concentraciones fisiológicas de Ca^{+2} y no puede pasar a través de membranas de espermatozoides intactos (Figura 2). Por lo tanto, la unión de la anexina V a la membrana de un espermatozoide indica que la integridad de su membrana se ha visto comprometida. Las bolas magnéticas de Anexina V pueden ser utilizadas para aislar células con externalización de PS, es decir, para detectar células con apoptosis temprana (Diricam y cols., 2008).

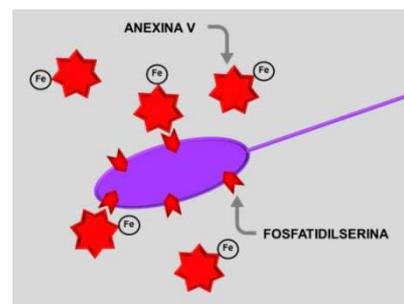


Figura 2. Unión de Anexina V a PS

El uso de MACS permite separar las células con PS externalizada en su superficie de aquellas con membranas más intactas. Cuando pasamos células a través de una columna con anexina V (figura 3) sometida a un campo magnético, las células con externalización de PS se quedan fijadas. Aquellas células no adheridas a la columna por presentar mayor integridad de membrana, serán las elegidas para los TRA (Said y cols., 2005).

Algunos autores señalan el beneficio de combinar las columnas de Anexina con la clásica técnica de los gradientes de densidad. Esta nueva combinación proporcionaría a los espermatozoides una mejor calidad en cuanto a términos de movilidad, viabilidad y apoptosis (Said y cols., 2006b), lo que resultaría importante para lograr unas tasas de concepción óptimas en las TRA (Said y cols., 2005; Tsung-Hsien y cols., 2010).

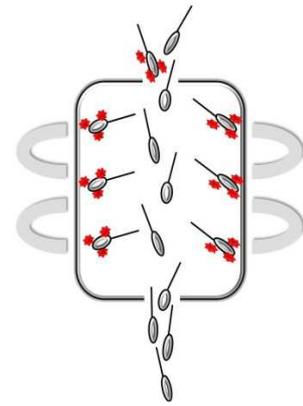


Figura 3. Paso de los espermatozoides por la columna

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los espermatozoides que externalizan en su membrana el fosfolípido PS, que es un marcador de apoptosis temprana, están asociados con un desarrollo inmaduro de su núcleo y una cromatina anormal. Esto puede estar relacionado con una peor tasa de fecundación, con una peor calidad embrionaria y con un aumento en el número de abortos.

Para las TRA, es importante la selección de espermatozoides libres de esta apoptosis temprana y ya no sólo proceder a la selección de espermatozoides basándose en criterios morfológicos y de vitalidad.

Es por ello, que el objetivo de este trabajo es hacer una revisión bibliográfica sobre la eficacia de la separación magnética de espermatozoides mediante columnas de anexina, método utilizado en los laboratorios de reproducción asistida para la selección espermática libre de apoptosis temprana. Mediante casos clínicos intentaremos mostrar su posible beneficio en cuanto a fecundación, calidad embrionaria y embarazo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Los casos clínicos utilizados para realizar el estudio, pertenecen a pacientes de la Clínica Recoletos de Valladolid durante el 2012/2013. La edad de los cuales está comprendida entre 30 y 43 años. Los pacientes en los que se aplicó la técnica de columnas de anexina presentan alguna patología seminal o bien sin presentarla, hay problemas implantatorios o abortos de repetición.

a) Obtención de las muestras seminales

Las muestras seminales se obtienen por masturbación, con un período de abstinencia previo de 3 a 5 días. Se recogen en un bote estéril, perfectamente identificado. El tiempo de entrega en el laboratorio debe realizarse durante los 60 minutos posteriores a la recogida.

b) Procesamiento de las muestras seminales

En el laboratorio se esperan entre 15-20 minutos hasta que las muestras licuen. Si esto no sucede de forma natural, se pasa la muestra por jeringuillas con aguja de insulina repetidas veces, hasta conseguir la licuefacción. Una vez licuadas, se mide el volumen del eyaculado y se toman 5 μ l para comprobar la motilidad y concentración de la muestra espermática inicial con una cámara *makler* y en caso de que fuese necesario, se ajusta la concentración hasta conseguir un número de células totales entre 10^5 y 10^8 .

A continuación se deposita en un tubo *falcon* de fondo cónico y se añade *buffer* en proporción 1:1. Centrifugación a 3000rpm durante 5 minutos y decantar dejando 0,2 ml. Añadir 100 μ l de *Reagent*, mezclar y dejar 15 minutos. Cuando hayan pasado 10 minutos, comenzar a montar las columnas de Anexina en el soporte magnético y realizar el lavado de las mismas con 500 μ l de *buffer* (figura 4). Filtrar por la columna ya lavada la mezcla compuesta por la muestra de semen y *Reagent* y recoger el producto filtrado en un tubo *falcon*.

Añadir 500 μ l de *buffer* y centrifugar a 1800rpm durante 4 minutos. Decantar con una pipeta dejando un volumen de 0,2-0,3 ml. Dejar en reposo a temperatura ambiente durante 20 minutos.



Figura 4. Columnas de Anexina

Por último se realiza la valoración final de concentración y motilidad seminal usando la cámara *makler*. Se utilizan parámetros estándar de la OMS (World Health Organization, 2010). Con la cámara *makler* se calcula la concentración y la motilidad progresiva de la muestra seminal, que son la suma de los grados A (progresión rápida) y B (progresión lenta) de motilidad.

La muestra ya está preparada para usarse en las TRA.

c) Inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)

Pasadas 4 horas después de la punción folicular, realizada de forma transvaginal, guiada por ecografía, y de la búsqueda y decumulación de los ovocitos, se realiza la ICSI.

La captura de los espermatozoides se realiza sobre PVP o G-MOPSTM PLUS (Vitrolife) dependiendo de la movilidad de la muestra obtenida. La selección de los espermatozoides a inyectar en los ovocitos, se lleva a cabo mediante parámetros morfológicos y mótiles.

Después de la microinyección, estos se depositan en una placa de cultivo con medio G-1™ (Vitrolife) y se introducen en el incubador a 37°C con el 6% de CO₂ y con una tasa de humedad del 98%.

La paciente comienza con un tratamiento para el soporte de la fase lútea.

d) Valoración de la fertilización y de la calidad embrionaria

Pasadas 18 horas tras la ICSI, se procede a la valoración de la fecundación en el microscopio invertido. Para que la fecundación sea óptima, se deben visualizar 2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares.

El desarrollo y la calidad embrionaria se valoran en día +2 (D+2) y día +3 (D+3), según criterios morfológicos indicados por ASEBIR como son: el número de células, nucleación y simetría de las blastómeras, la compactación celular, el ritmo de división, el porcentaje y tipo de fragmentación, la presencia de vacuolas, de moteado y el tipo de ZP. Se sigue un sistema de clasificación en categorías A, B, C y D. El grado A se asigna al embrión con óptima calidad y máxima capacidad implantatoria (figura 5) y el D al que menos.

Los embriones se cambian de medio en D+3 a G-2™ (Vitrolife).

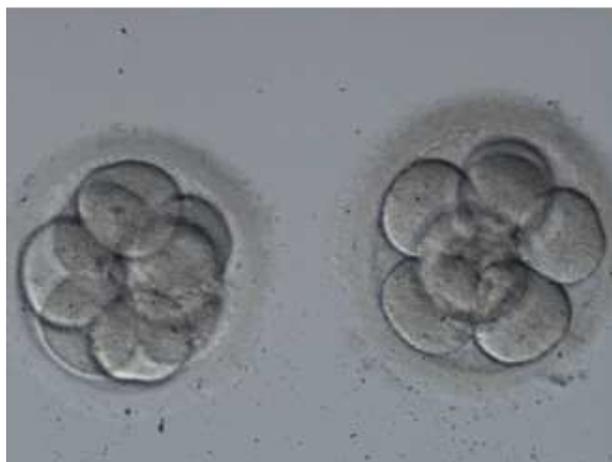


Figura 5. Embrión tipo A, D+3 ASEBIR.

d) Transferencia embrionaria

Las transferencias se realizan en D+2 o D+3, dependiendo del número y de la calidad de los embriones por paciente. En lo que respecta al número de embriones que son transferidos, la ley vigente 14/2006 permite hasta un máximo de 3.

Después de la transferencia se continúa con el tratamiento para el soporte de la fase lútea.

e) Diagnóstico del embarazo y evolución

A los 15 días de la transferencia embrionaria, se determina el diagnóstico del embarazo bioquímico, midiendo la concentración de la β hCG en sangre. Posteriormente y mediante ecografía se corroborará la presencia de saco embrionario y más adelante la presencia de latido fetal.

Los casos en que no haya desarrollo de saco embrionario, se produzca ausencia de latido fetal cardíaco o interrupción del desarrollo fetal, serían considerados como gestaciones no evolutivas o abortos.

f) Casos clínicos

Para mostrar la eficacia del uso de columnas de anexina en clínica, como método para la selección de espermatozoides, estudiaremos diez casos de pacientes que se sometieron a dicha técnica, haciendo referencia a tasa de fecundación, calidad embrionaria, implantación y embarazo y evolución del mismo.

4. RESULTADOS

Hemos estudiado un total de 10 pacientes, en los cuales se observan fallos de implantación, factores masculinos y abortos de repetición. En uno de los pacientes la aplicación de las columnas de anexina fue llevada a cabo durante el primer ciclo, en otros dos pacientes en un segundo ciclo, en cuatro pacientes en tercer ciclo y en otros cuatro pacientes en cuarto ciclo. Tan sólo uno de los pacientes fue tratado con columnas de anexina durante su tercer y cuarto ciclo consecutivos.

PACIENTE N° 1. 34 años. Las columnas de anexina se aplicaron en un 4° ciclo, tras realizar tres anteriores y haber fallos de implantación. La tasa de fecundación al aplicar las columnas es del 80% frente al 100% en primer y segundo ciclo y frente al 67% en tercer ciclo. No se observa una mejoría importante en cuanto a la calidad embrionaria, hay mejoría con respecto al primer y tercer ciclo, pero empeoramiento con respecto al segundo ciclo. Hay implantación de un único embrión, aunque termina en aborto.

PACIENTE	DATOS	1CICLO	2CICLO	3CICLO	4CICLO CON ANEXINA
1	DIAGNÓSTICO	FALLO DE IMPLANTACIÓN/NORMOZOOSPERMIA			
	N° OVOCITOS MICROINYECTADOS (MI)	4	8	6	5
	N° EMBRIONES	4	8	4	4
	CALIDAD	BBCC	ABBCCDD	BBCD	ACCD
	TE	BB D+3	AB D+3	BB D+2	AC D+3
	RESULTADO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
	EVOLUCIÓN				ABORTO

PACIENTE N° 2. 40 años. La aplicación de las columnas se realiza en el primer ciclo de ICSI, tras haber tenido dos fallos previos de IAC. La tasa de fecundación es del 100%. Se observa una muy buena calidad embrionaria, se consigue implantación de un único embrión y se logra que el embarazo sea evolutivo.

PACIENTE	DATOS	1 CICLO ANEXINA
2	DIAGNÓSTICO	ABORTOS DE REPETICIÓN/2FALLO IAC/NORMOZOOSPERMIA
	N°OVOCITOS MICROINYECTADOS (MI)	2
	N° EMBRIONES	2
	CALIDAD	AA
	TE	AA D+2
	RESULTADO	POSITIVO
	EVOLUCIÓN	EVOLUTIVO

PACIENTE N°3. 32 años. Se aplican las columnas en un tercer ciclo, tras haber tenido dos fallos de implantación. La tasa de fecundación al aplicar las columnas fue del 60% frente al 67% en primer ciclo y al 80% en segundo ciclo. Se observa una mejoría en cuanto a calidad embrionaria, hay implantación de un único embrión, y el embarazo es evolutivo.

PACIENTE	DATOS	1CICLO	2CICLO	3CICLO ANEXINA
3	DIAGNÓSTICO	FALLO DE IMPLANTACIÓN		
	N° OVOCITOS MICROINYECTADOS (MI)	3	5	5
	N° EMBRIONES	2	4	3
	CALIDAD	BC	CCDD	AAB
	TE	NO	CC D+3	AA D+2
	RESULTADO		NEGATIVO	POSITIVO
	EVOLUCIÓN			EVOLUTIVO

PACIENTE N°4. 30 años. Se aplican las columnas de anexina en un segundo ciclo, tras haber un aborto diferido durante el primer ciclo y haber diagnosticado una patología seminal, oligoastenozoospermia (muestra seminal con bajo recuento de espermatozoides y baja motilidad). La tasa de fecundación al aplicar las columnas es del 80% frente al 67% obtenida en el primer ciclo. Se observa mejoría en cuanto a la calidad embrionaria, hay implantación embrionaria de un único embrión, y el embarazo es evolutivo.

PACIENTE	DATOS	1CICLO	2CICLO ANEXINA
4	DIAGNÓSTICO	FACTOR MASCULINO/OLIGOASTENOZOOSPERMIA	
	N° OVOCITOS MICROINYECTADOS (MI)	6	5
	N° EMBRIONES	4	4
	CALIDAD	ACCDD	ABCD
	TE	AC D+3	AB D+3
	RESULTADO	POSITIVO	POSITIVO
	EVOLUCIÓN	ABORTO	EVOLUTIVO

PACIENTE N° 5. 43 años. Las columnas de anexina se aplican en un tercer ciclo, tras realizar dos ciclos previos en los que hubo fallos de implantación. Al aplicar las columnas, la tasa de fecundación fue del 67% frente al 67% obtenido en primer ciclo y al 75% en segundo ciclo. No hay mejoría de la calidad embrionaria, hay implantación de un único embrión aunque termina en aborto.

PACIENTE	DATOS	1CICLO	2CICLO	3CLICLO ANEXINA
5	DIAGNÓSTICO	FALLO IMPLANTACIÓN/NORMOZOOSPERMIA		
	N° OVOCITOS MICROINYECTADOS (MI)	3	8	6
	N°EMBRIONES	2	6	4
	CALIDAD	AD	ABCCCD	CCDD
	TE	AD D+2	AB D+3	CC D+3
	RESULTADO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
	EVOLUCIÓN			ABORTO

PACIENTE N°6. 37 años. Se aplican las columnas en un cuarto ciclo, tras haber realizado 3 previos con un fallo de implantación, y dos cancelaciones de TE por mala calidad embrionaria. Hay una patología seminal asociada, criptozoospermia (bajo número de espermatozoides en el eyaculado). La tasa de fecundación conseguida con las columnas es del 50% frente al 67% obtenido en primer ciclo, al 40% en segundo ciclo y al 100% en tercer ciclo. No se observa mejoría en cuanto a calidad embrionaria, pero sí se consiguió realizar la transferencia, hubo implantación embrionaria de un único embrión y el embarazo fue evolutivo.

PACIENTE	DATOS	1CICLO	2CICLO	3CICLO	4CICLO ANEXINA POSTPARTO
6	DIAGNÓSTICO	FACTOR MASCULINO/CRIPTOZOOSPERMIA			
	Nº OVOCITOS MICROINYECTADOS (MI)	9	10	4	10
	Nº EMBRIONES	6	4	4	5
	CALIDAD	CDDDDD	DDDD	DDDD	CDDDD
	TE	CD D+3	NO	NO	CD D+3
	RESULTADO	NEGATIVO			POSITIVO
	EVOLUCIÓN				EVOLUTIVO

PACIENTE N°7. 32 años. Se aplican las columnas de anexina en un tercer ciclo tras sufrir dos abortos diferidos en dos ciclos previos. Existe una patología seminal asociada, oligozoospermia (bajo recuento espermático en la muestra seminal). La tasa de fecundación es del 71% frente al 36% obtenido en primer ciclo y al 71% obtenido en el segundo ciclo. Se observa mejoría en cuanto a calidad embrionaria, hay implantación embrionaria de un único embrión y el embarazo fue evolutivo.

PACIENTE	DATOS	1CICLO	2CICLO	3CICLO ANEXINA
7	DIAGNÓSTICO	FACTOR MASCULINO/OLIGOZOOSPERMIA		
	N° OVOCITOS MICROINYECTADOS (MI)	11	7	7
	N° EMBRIONES	4	5	5
	CALIDAD	BBCD	BBCCD	ABCCD
	TE	BB D+3	BB D+3	AB D+2
	RESULTADO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	EVOLUCIÓN	ABORTO	ABORTO	EVOLUTIVO

PACIENTE N°8. 35 años. Se aplican las columnas de anexina en un segundo ciclo, tras terminar el primero con un aborto diferido. Patología seminal asociada, oligozoospermia. La tasa de fecundación con las columnas es del 100% frente al 50% conseguido en primer ciclo. No mejora la calidad embrionaria. Se consigue implantación embrionaria de un único embrión y evolución del embarazo.

PACIENTE	DATOS	1CICLO	2CICLO ANEXINA
8	DIAGNÓSTICO	FACTOR MASCULINO/OLIGOZOOSPERMIA	
	Nº OVOCITOS MICROINYECTADOS (MI)	8	6
	Nº EMBRIONES	4	6
	CALIDAD	AABC	ABBCC
	TE	AA D+3	AB D+2
	RESULTADO	POSITIVO	POSITIVO
	EVOLUCIÓN	ABORTO	EVOLUTIVO

PACIENTE N°9. 38 años. Las columnas de anexina se realizan en un tercer ciclo, tras dos fallos de implantación, y presencia de patología masculina, oligoastenozoospermia. La tasa de fecundación es del 63% frente al 18% conseguido en primer ciclo y al 14% obtenido durante el segundo. Hubo mejoría en cuanto a calidad embrionaria, se consiguió implantación embrionaria de un único embrión, aunque el embarazo no fue evolutivo.

PACIENTE	DATOS	1CICLO	2CICLO	3CICLO ANEXINA
9	DIAGNÓSTICO	FALLO IMPLANTACIÓN/FACTOR MASCULINO/OLIGOASTENOZOOSPERMIA		
	N° OVOCITOS MICROINYECTADOS (MI)	11	7	8
	N° EMBRIONES	2	1	5
	CALIDAD	AC	B	ABDDD
	TE	AC D+2	B D+2	AB D+2
	RESULTADO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
	EVOLUCIÓN			ABORTO

PACIENTE N° 10. 38 años. Se aplican columnas de anexina durante dos ciclos consecutivos. En el tercer ciclo, primero con columnas de anexina, la tasa de fecundación es del 64% frente al 50% obtenido en primer ciclo y en cuarto ciclo también con uso de columnas de anexina y frente al 33% obtenido en segundo ciclo. La aplicación de las columnas no mejora la calidad embrionaria, y aunque se consigue implantación de un único embrión, aunque el embarazo no fue evolutivo.

PACIENTE	DATOS	1CICLO	2CICLO	3CICLO ANEXINA	4CICLO ANEXINA
10	DIAGNÓSTICO	FACTOR MASCULINO/CRIPTOZOOSPERMIA			
	N° OVOCITOS MICROINYECTADOS (MI)	2	12	11	10
	N° EMBRIONES	1	4	7	5
	CALIDAD	B	ABDD	ABDDDDD	BBCDD
	TE	B D+2	AB D+2	AB D+2	BBC D+3
	RESULTADO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
	EVOLUCIÓN			ABORTO	ABORTO

5. DISCUSIÓN

Uno de los factores más importantes para el éxito en las TRA es la calidad del esperma. Dada la importancia que está cobrando el papel paterno en la reproducción, y dado el resultado no tan óptimo de las TRA, se están buscando constantemente nuevas alternativas para seleccionar el mejor espermatozoide.

En la mayoría de los laboratorios de reproducción asistida la selección de espermatozoides únicamente se realiza bajo criterios morfológicos y mótils. Esto no es plenamente fiable, ya que estos criterios no aportan información acerca de los eventos de muerte celular programada, apoptosis, los cuales afectan de manera considerable a las tasas de fecundación, a las tasas de embarazo y al desarrollo del mismo en el tiempo. (Boe-Hansen y cols., 2006; Avendaño y cols., 2008). La apoptosis puede deberse a numerosos factores, pero uno de los que cobra más importancia son las ROS. Al realizar la técnica clásica de separación espermática, el contenido celular eyaculado se almacena en la parte inferior como un pellet, lo que supone que leucocitos y espermatozoides anormales estén en contacto con los espermatozoides maduros. Se ha demostrado que la presencia de leucocitos y espermatozoides anormales producen un aumento de las ROS, lo que dañaría de forma considerable a los espermatozoides maduros (Diricam y cols., 2008).

En busca de una nueva técnica para dar solución a estos problemas, surgen las columnas de anexina, que realizan una selección espermática mediante separación magnética. Es un método que reduce los espermatozoides con fragmentación del ADN (De Vantéry y cols., 2009) y separa eficazmente los espermatozoides apoptóticos de los no apoptóticos (Buzzi y cols., 2010). El uso de columnas de anexina es perfecto para parejas con fallos anteriores en TRA (Gil y cols., 2013). La combinación de las columnas de anexina con la clásica técnica de los gradientes de densidad incrementa el número de embarazos clínicos y las tasas de implantación (Diricam y cols., 2008).

Es por todo ello que llevamos a cabo un análisis de 10 pacientes con fallos previos en TRA, a los que se les aplica finalmente el tratamiento con columnas de anexina. Cinco de los casos presentan una patología seminal, tres tienen fallos de implantación, uno de ellos presenta ambos problemas, y el último se somete al tratamiento por dos

fallos repetidos en IAC. Se analizan los resultados obtenidos en cuanto a tasas de fecundación, calidad embrionaria, embarazo y evolución del mismo.

En cuanto a las tasas de fecundación hay bastante controversia en nuestros resultados. En 3 de los casos (4, 8, 9), se observa un aumento de esta tasa tras la aplicación de las columnas de anexina a la muestra seminal. En otros 6 casos (1, 3, 5, 6, 7, 10), o bien se mantiene la tasa con respecto a ciclos anteriores, aumenta ligeramente o empeora. En 1 de los casos no se pueden establecer comparaciones con ciclos previos (2). En la literatura ocurre lo mismo, algunos autores remarcan que las columnas de anexina mejoran la tasa de fecundación (Rawe y cols., 2010; Polak de Fried y Denaday, 2010). En el estudio realizado por el grupo de Rawe, la tasa de fecundación con un ciclo ICSI sin columnas de anexina fue del 45%. Tras aplicar las columnas, la tasa de fecundación subió hasta el 60%. En el realizado por Polak de Fried y Denaday se pasa de una tasa de fecundación del 0% a otra del 67% tras la aplicación de las columnas de anexina. En cambio, otros estudios señalan que no encuentran diferencias en las tasas de fecundación tras la aplicación de las columnas de anexina (Diricam y cols., 2008).

Algunos autores afirman que el hecho de utilizar el mejor espermatozoide en las TRA garantiza que la calidad embrionaria mejore (Diricam y cols., 2008). Sin embargo, y tras analizar nuestros resultados, vuelve a haber controversia al respecto. En 4 de los casos (3, 4, 7, 9) se observa una mejor calidad tras el uso de las columnas. En cambio en 3 de los casos (5, 8, 10) se ve un empeoramiento. En otros 3 (1, 6, 10) la calidad mejora o empeora dependiendo de los ciclos que compares. En el caso (2) no se pudo establecer comparación previa.

Donde nuestros datos tienen absoluta consonancia es en lo referido al embarazo. En todos los casos tras la aplicación de las columnas, las pacientes consiguieron tener un resultado positivo implantatorio, de un único embrión y por tanto hubo gestación. Lo mismo puede observarse en el estudio de Rawe y colaboradores en 2010, donde tras un ciclo fallido de ICSI, se aplicaron las columnas de anexina, se transfirieron 2 embriones y se consiguió implantación de un embrión y embarazo. En un meta análisis llevado a cabo por Gil y colaboradores en el 2013, los resultados de cuatro ensayos indicaron una tasa de embarazo significativamente mayor en los pacientes que se sometieron a la

selección de espermatozoides mediante columnas de anexina en comparación con los que recibieron el tratamiento sin columnas.

A pesar de que hubo implantación en todos los casos, tras el uso de las columnas de anexina, el embarazo tan sólo en 6 fue evolutivo y se consiguió el nacimiento de un niño sano. En los otros 4 hubo abortos diferidos. Como bien señalan algunos estudios, las tasas de abortos, no varían cuando se usan las columnas de anexina o cuando se utilizan los métodos convencionales (Gil y cols., 2013).

6. CONCLUSIONES

De presente trabajo se han extraído las siguientes conclusiones, asociadas a un grupo muy concreto y pequeño de pacientes con patologías seminales y fallos de implantación:

1. Las tasas de fecundación no se ven incrementadas en todos los casos tras la aplicación de las columnas de anexina. Por lo que no podemos establecer que este tratamiento mejore las tasas de fecundación.

2. La calidad embrionaria no mejora de manera unánime, por lo que no podemos asegurar el beneficio de las columnas de anexina en dicho aspecto.

3. La implantación embrionaria de un único embrión sucede en todos los casos, por lo que todas las pacientes quedan gestantes tras la aplicación de las columnas de anexina, incluso habiendo transferido un embrión de mala calidad. Esto parece indicar que las columnas de anexina mejoran la implantación embrionaria. Aunque como bien hago referencia al principio, el estudio es sobre un grupo de pacientes pequeño y concreto, por lo que para reafirmar esta conclusión habría que realizar nuevos estudios.

4. En 6 de los casos, el embarazo es evolutivo, dando lugar al nacimiento de un niño sano.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Aunque todo parece indicar que la aplicación de las columnas de anexina en clínica aportaría beneficios a pacientes con patologías seminales y problemas de implantación, aún hay demasiada controversia en determinados aspectos, por lo que hay que seguir investigando.

Para mejorar los resultados, y hacer evidentes los beneficios de las columnas de anexina en las TRA, los nuevos estudios deben considerar el factor femenino, utilizar un número elevado de pacientes y trabajar bajo condiciones estándar (Gil y cols., 2013).

8. BIBLIOGRAFÍA

Avendaño,C., Franchi,A. y Taylor,S. (2008). Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 91:1077-1084.

Boe-Hansen,G., Fedder,J., Ersboll,A. y Chirstensen,P. (2006). The sperm chromatin structure assay a diagnosis tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, 21:1576-1582.

Bolle,P., Evandri,M.G. y Saso,L. (2002). The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. *Contraception Journal*, 65:313-315.

Brookings,C., Goldmeier,D. y Sadeghi-Nejad,H. (2013). Sexually Transmitted Infection and Sexual Function in Relation to Male Fertility. *Korean Journal of urology*, 54:149-156.

Buzzi,J., Valcarcel,A., Lombardi,E., Oses,R., Rawe,V., Young,E. y cols. (2010). Magnetic activated cell sorting (MACS) improves oocyte donation results associated to severe male factor infertility. *Human reproduction*, 25suppl 1:i118-152.

De Vantéry,C., Lucas,H., Chardonnens,D. y De Agostini,A. (2009). Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7:1.

Diricam,E.K., Özgün,O.D., Akarsu,S., Akin,K.O., Ercan,O., Uğurlu,M. y cols. (2008). Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25:375-381.

Flesch,F.M. y Gadella,B.M. (2000). Dynamics of mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et biophysica acta*, 1469:197-235.

Gil,M., Sar-Shalom,V., Melendez,Y., Carreras,R. y Checa,M.A. (2013). Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30:479-485.

Glander,H.J. y Schaller,J. (1999). Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Molecular Human Reproduction*, 5:109-115.

Greco,E., Iacobelli,M., Rienzi,L., Ubaldi,F., Ferrero,S. y Tesarik,J. (2005). Reduction of Incidence of Sperm DNA Fragmentation by Oral Antioxidant Treatment. *Journal of Andrology*, 26:349-353.

Grunewald,S. y Paasch,U. (2013). Sperm selection for ICSI using annexin V. *Spermatogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Chapter 23, 927:257-262.

Henkel,R. y Schill,W-B. (2003). Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1:108.

Henkel,R. (2012). Sperm preparation: state-of-the-art-physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian Journal of Andrology*, 14:260-269.

Jameel,T. (2008). Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. *Journal of Pakistan Medical Association*, 58:71-74.

Makker,K., Agarwal,A. y Sharma,R.K. (2008). Magnetic activated cell sorting (MACS): utility in assisted reproduction. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46:491-497.

Martin-Du Pan,R.C. y Sakkas,D. (1998). Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Are anti-oxidants useful in the treatment of male infertility? *Human Reproduction*, 13:2984-2985.

Molina,I. (2012). Atención a los deseos reproductivos de las parejas con enfermedad infecciosas transmisibles (VIH, hepatitis B y hepatitis C). Tesis doctoral. Facultad de medicina. Universidad de Granada.

Ombelet,W., Deblaere,K., Bosmans,E., Cox,A., Jacobs,P., Janssen,M. y cols. (2003). Semen quality and intrauterine insemination. *Reproductive BioMedicine Online*, 7(4):485-492.

Palermo,G., Joris,H., Devroey,P. y Van Steirteghem,A.C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340(8810):17-18.

Polak de Fried,E. y Denaday,F. (2010). Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failfure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertility and Sterility*, 94(1):351.e15-351.e18.

Ramos,L., De Boer,P., Meuleman,E., Braat,D.D. y Wetzels,A.M. (2004). Chromatin condensation and DNA damage of human epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Reproductive BioMedicine Online*, 8(4):392-397.

Rawe,V., Álvarez,C., Uriondo,H., Papier,S., Miasnik,S. y Nodar,F. (2009). Separación magnética por columnas de anexina V: “filtrado molecular” para selección de espermatozoides no apoptóticos. *Reproducción*, 24:104-114.

Rawe,V., Uriondo,H., Álvarez,C., Carro,M., Papier,S. y Nodar,F. (2010). Healthy baby born after reduction sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reproductive BioMedicine Online*, 20:320-323.

Schiller,J., Arnhold,J., Glander,H-J. y Arnold,K. (2000). Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy-effects of freezing and tawing. *Chemistry and physics of Lipids*, 106:145-156.

Said,T., Grunewald,S., Paasch,U., Rasch,M., Agarwal,A. y Glander,H.J. (2005). Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertility and Sterility*, 83(5):1442-1446.

Said,T., Agarwal,A., Grunewald,S., Rasch,M., Baumann,T., Kriegel,C. y cols. (2006a). Selection of Nonapoptotic Spermatozoa As a New Tool for Enhancing Assisted Reproduction Outcomes: An In Vitro Model. *Biology of Reproduction*, 74:530-537.

Said,T., Agarwal,A., Grunewald,S., Rasch,M., Glander,H.J. y Paasch,U. (2006b). Evaluation of Sperm Recovery following Annexin V MACS Separation. *Reproductive BioMedicine Online*, Chapter 6, 13(3):336-339.

Sail,T., Gaglani,A. y Agarwal,A. (2010). Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive BioMedicine Online*, 21:456-462.

Sánchez,I., Mar,C., Castilla,J.A., Marcos,M., Martín,I., Galán,A. y cols. (2009). Técnicas para la preparación de semen en reproducción asistida. *Documentos de la SEQC*. Documento C. Fase 3. Versión 4.

Tapia-Serrano,R. (2012). Una visión actual de la infertilidad masculina. *Reproductive Medicine Review*, 4(3):103-109.

Tsung-Hsien,L., Chung-Hsien,L., Yang-Tse,S., Hui-Mei,T., Chun-Chia,H., Hsiu-Hui,C. y cols. (2010). Magentic activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Human Reproduction*, 25:839-846.

Uriondo,H., Álvarez,C., Gil,M.V., Frazer,P., Serna,J. y Nodar,F. (2011). Niveles de correlación entre la externalización de fosfatidilserina y apoptosis espermática en pacientes con infertilidad masculina. *Reproducción*, 26:111-116.

Wang,X., Sharma,R.K., Sikka,S.C., Thomas,A.J.Jr., Falcone,T. y Agarwal,A. (2003). Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 80:531-535.

World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition.

Zegers-Hochschild,F., Adamson,G.D., De Mouzon,J., Ishihara,O., Mansour,R., Nygren,K. y cols. (2009). Internacional Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertility and Sterility*, 92:1520-1524.

Gracias a todas y cada una de las personas que han formado parte de este proyecto, de este reto, de esta ilusión. Gracias por estar a mi lado, valorando mis avances, sosteniendo mis caídas y haciendo mi camino mucho más fácil.

“La biología es determinante en la manera en que vivimos. Desde el momento en que nacemos, sabemos cómo respirar y comer. A medida que crecemos, aparecen nuevos instintos. Nos transformamos en territoriales, aprendemos a competir, buscamos refugio ¿Lo más importante de todo? Nos reproducimos.”