



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESPECIALIZACIÓN EN GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE MEDICINA

RESULTADOS REPRODUCTIVOS CON EL USO DE
ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS MEDIANTE SWIM-UP VS EL
USO DE SWIM-UP ASOCIADO A SEPARACIÓN CELULAR
MAGNÉTICA POR COLUMNAS DE ANEXINA V.

TITULACIÓN CON TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE ESPECIALIDAD EN
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

PRESENTA:

DR. KIYOSHI ARTURO MACOTELA NAKAGAKI

COORDINADOR CLÍNICO DE TESIS

COORDINADOR METODOLOGICO DE TESIS

DR. JUAN GERARDO BARROSO VILLA

PROFESOR TITULAR DEL CURSO

DR. HORACIO SUAREZ DEL PUERTO

MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. JOSÉ HALABE CHEREM
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN MÉDICA
CENTRO MÉDICO ABC
FACULTAD DE MEDICINA UNAM

DR. FELIX MUÑUZURI IÑIGUEZ
JEFE DEL SERVICIO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
CENTRO MÉDICO ABC

DR. HORACIO SUAREZ DEL PUERTO
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
CENTRO MÉDICO ABC

DR. JUAN GERARDO BARROSO VILLA
ASESOR DE TESIS
ASESOR METODOLOGICO
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
CENTRO MÉDICO ABC

DRA. ALINNE COLIN VALENZUELA
ASESOR DE TESIS
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
CENTRO MÉDICO ABC

INDICE

RESUMEN	4
AGRADECIMIENTOS	5
DISEÑO DEL ESTUDIO	7
INTRODUCCIÓN	8
MARCO TEÓRICO	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
JUSTIFICACIÓN	23
OBJETIVOS E HIPOTESIS	24
METODOLOGÍA	25
VARIABLES DEL ESTUDIO	28
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	31
PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	38
CONCLUSIONES	41
ANEXO A	42
ANEXO B	43
REFERENCIAS	44

RESUMEN

Objetivo: Comparar la tasa de fertilización y el desarrollo embrionario en técnicas de reproducción asistida avanzada, como son fertilización in vitro (FIV) y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) en dos preparaciones seminales como swim-up y la separación celular magnética por columnas de Anexina V (MACS), de acuerdo a la morfología espermática.

Material y Métodos: Se trata de un estudio piloto experimental, de tipo cohorte, analítico, longitudinal y prospectivo. La muestra se obtuvo de forma aleatoria en el Centro de Reproducción Arcos, de julio del 2012 a diciembre del 2012. Se incluyeron un total de 387 ovocitos en metafase II asignados a 4 grupos de acuerdo al método de preparación seminal y la técnica de inseminación, de la siguiente manera: grupo A (swim-up con ICSI), grupo B (MACS + swim-up con ICSI), grupo C (swim-up con FIV), grupo D (MACS + swim-up con FIV), en cada grupo la morfología espermática fue evaluada según los criterios estrictos de Kruger: 1-4%, 5-10% y mayor a 11% de formas normales de espermatozoides. Finalmente, se analizó la tasa de fertilización y el desarrollo embrionario: i) división embrionaria (número de células), ii) porcentaje de fragmentación y iii) multinucleación en días 2 y 3. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, la prueba exacta de Fisher y la prueba de X².

Resultados: La demografía de los pacientes fue similar, y no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos. La tasa de fertilización fue significativa entre ambas técnicas de reproducción asistida independientemente del método de preparación seminal utilizado (ICSI SU: 84.46% vs FIV SU: 63.04%, $p=0.0009$; ICSI SU + MACS 87.25% vs FIV SU + MACS 70%, $p = 0.0042$), pero no entre los diferentes métodos de preparación seminal (ICSI SU: 84.86% vs ICSI SU + MACS: 87.25%, $p= 0.6892$; FIV SU: 63.04% vs FIV SU + MACS: 70.0% , $p=0.3488$). Por otra parte, la tasa de fertilización en pacientes con teratozoospermia (morfología espermática <4% según los criterios estrictos de Kruger) fue de: 78%, 85%, 36% y 53% para el grupo A, B, C y D respectivamente. Aunque no hubo diferencias significativas, hay una clara tendencia hacia mejores tasas de fertilización con el uso combinado de ambas técnicas de preparación seminal: MACS + Swim-up en comparación con el uso único de Swim-up. Finalmente, no hubo diferencias significativas entre los diferentes grupos al comparar distintos parámetros de desarrollo embrionario.

Conclusiones: La aplicación de dos técnicas de preparación espermática (MACS + Swim-up) en sujetos masculinos con teratozoospermia (morfología <4%, según los criterios estrictos de Kruger) demostró un beneficio en la tasa de fecundación y el desarrollo embrionario ya sea para la FIV o ICSI, en comparación con swim-up. Sin embargo, se requiere un tamaño de muestra más grande para demostrar una diferencia significativa en el proceso de fertilización.

AGRADECIMIENTOS

La finalización de esta tesis, va de la mano de la residencia y por tanto quisiera aprovechar para agradecer a todas las personas que de una forma u otra tuvieron un efecto positivo en mi enseñanza: doctores, enfermeras, internos, pacientes y compañeros residentes (Paulett y Arturo) los llevo en mi mente y corazón y les estoy profundamente agradecido.

En especial al Dr. J. Gerardo Barroso Villa, Dra. Alinne Colin, Dr. Carlos Valdespin y la Q.F.B. Rosaura por su tiempo, paciencia y conocimientos para el desarrollo y elaboración de esta tesis.

A las dos personas mas importantes e inspiración de mi vida, mi mamá y papá por contar siempre con su apoyo, dirección y aliento incondicional para todas mis locuras, las palabras nunca me alcanzaran para expresarles el gran amor, gratitud y la bendición que son para mí, soy quien soy gracias a ustedes.

DATOS GENERALES

1.1. TITULO DEL PROYECTO.

“Resultados reproductivos con el uso de espermatozoides capacitados mediante swim-up vs el uso de swim-up asociada a separación celular magnética por columnas de Anexina V (MACS).”

1.2. AREA DE INVESTIGACION: CLÍNICA.

1.3. SUBAREA DE INVESTIGACION: GINECOLOGÍA, OBSTETRICIA E INFERTILIDAD.

1.4. LINEA DE INVESTIGACIÓN: REPRODUCCIÓN ASISTIDA.

1.5. FECHA DE INICIO: JULIO 2012

FECHA DE TERMINACION: DICIEMBRE 2012

DISEÑO DEL ESTUDIO

3.1. TIPO DE INVESTIGACION.

EXPERIMENTAL	<u>_x_</u>
CUASI-EXPERIMENTAL	---
OBSERVACIONAL	---

3.2 TIPOS DE DISEÑOS.

EXPERIMENTO O ENSAYO CLINICO	---
ESTUDIO DE COHORTE	<u>_x_</u>
ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES	---
ESTUDIO TRANSVERSAL	---

3.3. CARACTERISTICAS DEL ESTUDIO.

ANALITICO	<u>_x_</u>	DESCRIPTIVO	---
LONGITUDINAL	<u>_x_</u>	TRANSVERSAL	---
PROSPECTIVO	<u>_x_</u>	RETROSPECTIVO	---

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La historia de las técnicas en reproducción asistida, tiene sus orígenes a finales del siglo XIX, concretamente en 1890, cuando Heape¹ transfirió exitosamente embriones de conejo. Heape recuperó dos embriones al lavar las trompas de una coneja fecundada horas antes y luego los transfirió a las trompas de una coneja de raza belga; de estos embriones nacieron seis conejos completamente sanos.

En 1951, Chang y Austin en forma independiente descubrieron el fenómeno de capacitación espermática (cambios por los que el espermatozoide debe pasar para adquirir la capacidad fecundante).^{2,3} Posterior a este descubrimiento, los científicos se volvieron conscientes de la dificultad de seleccionar los criterios apropiados para la fecundación *in vitro* y de diferenciarlos de la activación partenogenética del óvulo. En 1959, Chang superó esta barrera y logró el nacimiento de unos conejos como resultado de la fecundación *in vitro*, cambiando la técnica por la transferencia de Heape.

A finales de 1960, comenzó a utilizarse el laparoscopio para visualizar los órganos pélvicos, Steptoe fue el precursor de su uso en la ginecología, para finales de 1968 ya había realizado más de 1,300 procedimientos. Esta técnica demostró ser ideal para la recolección de ovocitos y se consolidó con las modificaciones de Wood, perteneciente al grupo de Melbourne.

El primer embarazo uterino llevado a término, conseguido en seres humanos, fue logrado por el ginecólogo Patrick C. Steptoe y el biólogo Robert G. Edwards (Figura 1). El hito se realizó en Inglaterra, y culminó con el nacimiento de un producto femenino, sano, de 2,700 g, el 25 de julio de 1978 por vía cesárea.⁴

Steptoe aspiró el ovocito preovulatorio el 10 de noviembre de 1977 por vía laparoscópica, a la mitad del ciclo ovárico natural, identificando la evolución folicular con mediciones de estrógenos cada 24 horas y determinando el pico de hormona luteinizante por ensayos

en muestras de orina tomada cada tres horas. El embrión de ocho células se desarrolló en el laboratorio de Edwards y fue transferido al útero de su madre 2.5 días después de la captura ovular, a través del canal cervical.



Figura 1. Patrick C. Steptoe - Robert G. Edwards

La estimulación ovárica en humanos, se describió por primera ocasión a finales de 1960, aumentando la producción de óvulos en pacientes con posibles problemas citogenéticos, mediante la utilización de la hormona folículo estimulante humana (FSH). El grupo de Melbourne utilizó el citrato de clomifeno, seguido de un pico de gonadotropina coriónica humana para inducir la ovulación.⁵

En 1981, Lenz reportó por primera vez, la utilización del ultrasonido para la aspiración percutánea de los folículos.⁶ Siendo en 1988, cuando se inició la micromanipulación de gametos con la técnica de SUZI (*subzonal sperm injection*), logrando el primer embarazo de esta manera.⁷ Al año siguiente en 1989, se introdujo la PZD (*partial zonal dissection*), y se consiguió el embarazo por otra forma de micromanipulación de gametos. En 1992, se produjo otro gran hito con la técnica de ICSI (*intra-cytoplasmic sperm injection*), que prácticamente desplazó a las otras formas de micromanipulación debido a su buena tasa de éxito.⁸

La criopreservación de embriones mamíferos tuvo su inicio en 1972, teniendo como base los estudios experimentales de Wilmut y Whittingham, quienes mostraron que el enfriamiento lento de embriones de ratón, en etapas tempranas de división, hasta temperaturas por debajo de los 0°C, en presencia de dimetil sulfóxido (DMSO) y su calentamiento lento durante la fase de descongelamiento, producía una buena supervivencia embrionaria y el desarrollo a término.

Trounson y Mohr⁹, criopreservaron por primera vez embriones humanos de manera satisfactoria usando una variación del método antes descrito y con ello se introdujo la criopreservación de embriones en los programas de la fecundación *in vitro*. En 1986 se produjo el primer embarazo con un óvulo criopreservado.

MARCO TEÓRICO

En técnicas de reproducción asistida (TRA), se han desarrollado numerosas técnicas para aislar espermatozoides capaces de fertilizar ovocitos. Las primeras metodologías sólo se centraban en el aislamiento de espermatozoides viables, con el progreso de los métodos de reproducción asistida, sobre todo inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), se hizo evidente que estos parámetros no son suficientes para la identificación de los espermatozoide más adecuados para la fertilización.

Las técnicas convencionales de preparación de espermatozoides, swim-up, densidad de centrifugación en gradiente y la filtración de lana de vidrio, no son suficientemente eficaces para producir poblaciones de espermatozoides libres de daños en el DNA.

Durante la eyaculación, decenas de millones de espermatozoides son depositados por el hombre en la parte superior de la vagina cerca del orificio cervical, donde comienzan su viaje en una carrera competitiva a través del tracto genital femenino, para alcanzar y fertilizar el ovocito en la ampolla de las trompas de Falopio.

Con respecto al número total de espermatozoides eyaculados, sólo el 10% entrará en el cuello uterino, 1% el útero y 0,1% a la trompa de Falopio. Finalmente, fuera de los 10^2 - 10^3 espermatozoides que alcanzarán el complejo cumulus-ovocito, sólo un espermatozoide fertilizará el ovocito.

El análisis del semen es usado para evaluar la capacidad fértil del hombre. La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha establecido una serie de parámetros que relacionan la calidad del semen con la fertilidad. Tabla 1. Sin embargo, el resultado de un seminograma normal, no necesariamente correlaciona con el potencial de fertilidad, por lo que actualmente la concentración, la movilidad y morfología no son características suficientes para distinguir a los hombres fértiles de los subfértiles.

Parámetro	Valor mínimo de referencia
Volumen de semen	1,5 mL
pH	7,2
Nº total de espermatozoides/eyaculado	39 millones
Nº de espermatozoides/mL	15 millones
Motilidad total (progresiva + no progresiva)	40%
Motilidad progresiva	32%
Vitalidad	58%
Morfología espermática	4%

Tabla1. Valores de Referencia de estándares para las características del semen. OMS 2010. ¹⁰

Se han estudiado las anormalidades cromosómicas en el espermatozoide, como aneuploidías, las cuales muestran un rol importante en la etiología de la infertilidad. Las aneuploidías cromosómicas, pueden surgir como un evento de *novo*, durante la meiosis o durante la mitosis posterior a la fecundación. El daño del DNA espermático, puede darse a nivel mitocondrial o nuclear por las siguientes causas: apoptosis, ruptura de cadenas del DNA durante la espermatogénesis, fragmentación del DNA post-testicular, por especies reactivas de oxígeno, radioterapia, quimioterapia. De lo anterior, el daño post-testicular es la principal causa de fragmentación del DNA espermático.

Con el advenimiento de las técnicas de reproducción asistida (TRA), se han desarrollado estrategias de separación espermática del plasma seminal, que se basan principalmente en los procesos de motilidad, adhesión y filtración. En los primeros años de la ART, el enfoque era la obtención de espermatozoides motiles, en los últimos años, la atención se centró en el aislamiento de los espermatozoides funcionales, correlacionado con los resultados de la fertilización in vitro.

Mediante el empleo de las estrategias convencionales de preparación de semen para TRA, los procesos naturales de selección de espermatozoides que se producen en los distintos niveles del tracto genital femenino, son omitidos.

En el caso de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), donde un solo espermatozoide es inyectado en el óvulo, todas las barreras naturales para la fertilización se pasan por alto e incluso los componentes de espermatozoides que normalmente no entran en el gameto femenino son introducidos. Espermatozoides con daño en el DNA nuclear son capaces de fertilizar ovocitos, dependiendo del defecto intrínseco se relacionara con alteración en el desarrollo embrionario, una tasa de implantación baja y un incremento en la probabilidad de aborto, ocasionando una pérdida recurrente de embarazos.¹¹

Alrededor de estas incógnitas, los científicos y los médicos instan a mejorar las técnicas de separación de espermatozoides, con el fin de seleccionar el espermatozoide más funcional para la fertilización. El énfasis está más bien, en la salud de la prole que en lograr el embarazo o aumento en las tasas de éxito de las técnicas de reproducción asistida. In vivo, el proceso de selección del espermatozoide, está totalmente controlado por el tracto genital femenino y para lograr la selección basada en estos principios naturales, los científicos y los médicos necesitan entender los procesos de selección con el fin de imitar los mecanismos químicos y físicos involucrados.

SITIOS DE SELECCIÓN NATURAL DE ESPERMATOZOIDEOS

La selección de los espermatozoides, en el tracto genital femenino es un proceso extremadamente eficiente y riguroso, que se lleva a cabo en varios niveles, cérvix, útero, salpínge, cúmulos ooforus y zona pelúcida. La selección de los espermatozoides funcionales en estos sitios se consigue mediante una variedad de mecanismos mecánicos, bioquímicos y biofísicos.

CÉRVIX

En el ser humano, después de la eyaculación, el semen forma un gel acuoso por coagulación. Después de aproximadamente 30 minutos a 1 hora, este coágulo es enzimáticamente degradado por el antígeno prostático específico y los espermatozoides salen con rapidez del plasma seminal. El plasma seminal, no sólo protege la célula germinal masculina y proporciona una fuente de energía, también de ser expuesto a los

espermatozoides durante demasiado tiempo, disminuye su función, por tanto la rápida salida de los espermatozoides del plasma seminal es esencial.

El grado de hidratación del moco cervical determina su penetración, la microarquitectura de este moco depende de la etapa del ciclo menstrual, en la etapa pre-ovulatoria el moco contiene fibras lineales, flexible y alineado, el moco ovulatorio se compone de glóbulos flotantes de agregados de mucina, lo que explica la rápida circulación de los espermatozoides a través del moco cervical.

Los mecanismos por los cuales la selección de espermatozoides en el moco cervical es realizada, se cree que son debido a la motilidad de los espermatozoides y habilidad del moco cervical para seleccionar los espermatozoides basándose en su morfología. Observaciones recientes han revelado que las gotas citoplasmática regulan el volumen osmótico, por lo tanto, son esenciales para su funcionamiento.¹² Un volumen regulatorio disminuido de la célula germinal masculina, está relacionada con buena movilidad y el fracaso en la disminución de volumen regulador resultará en un obstáculo para la penetración del moco.¹³

ÚTERO

Una teoría relativamente nueva de Velando y cols. considera a los leucocitos en el moco cervical y el útero como parte de un mecanismo selección que los espermatozoides funcionales tienen que superar. Estos leucocitos producen niveles elevados de especies reactivas de oxígeno, que no sólo dañarían a los espermatozoides, sino también provocan un aumento en la permeabilidad de la membrana a iones esenciales para la capacitación, quimiotaxis y movilidad por hiperactivación; procesos que no deben ocurrir en el útero. Una vez que los espermatozoides, se movilizan fuera del plasma seminal protector, pierden progresivamente la protección por los reactivos de oxígeno y factores decapacitantes como la espermina o glicodelina -S, las cuales son abundantes en el líquido seminal.

SALPINGE

El ambiente cambia de hostil a uno que conserva, mejora la viabilidad de los espermatozoides y la motilidad, estimulando la capacitación. Hasta ahora, los dos mecanismos complementarios para la orientación de los espermatozoides en la salpinge han sido revelados.

Un mecanismo termotáctico, regulado a través de un receptor de Ca^+ intracelular de inositol trifosfato, por el cual los espermatozoides capacitados son liberados desde el sitio de almacenamiento y los orienta hacia el ámpula, donde una temperatura menor de 2°C prevalece durante la ovulación. Cerca del ovocito, existe un segundo mecanismo de corto alcance, quimiotáctico que conduce al reclutamiento de una población de espermatozoides capacitados.

CUMULUS OOPHORUS

Una vez que los espermatozoides contactan el complejo cumulus - ovocito, se inicia un proceso mediado por quimioataxis derivados de fluido folicular, células del cumulus y del ovocito.

Las células del cumulus convierten la glicodelina-A y F en cúmulos de glicodelina-C, eliminando así las actividades inhibitoras de glicodelinas-A y F mejorando la zona de unión espermática.¹⁴ La matriz del cumulus tiene propiedades viscoelásticas y sólo puede ser penetrada por espermatozoides hiperactivados.

Un componente importante de la matriz extracelular del cumulus es el polisacárido lineal de ácido hialurónico (HA), compuesto de repetidos alternos de D-glucurónico y residuos de N-acetil-D glucosamina. El ácido hialurónico forma un complejo con una proteína que interactúa con la glicodelina, que retiene y concentra glicodelina-C, la cual es esencial para la unión del esperma con la zona de unión.

ZONA PELÚCIDA

Representa el tercer lugar después de moco cervical y del cumulus, donde la selección de las características morfológicas se lleva a cabo. También indica la importancia de la

morfología normal del espermatozoide como parámetro, ya que se correlaciona muy bien con numerosas funciones, que incluyen la reacción del acrosoma y la integridad del DNA normal.

ESTUDIOS DE APOPTOSIS EN ESPERMATOZOIDES

Aproximadamente 15% de las parejas no pueden concebir después de un año de intentar un embarazo, de ellas 40% se deben a un factor masculino. Estudios recientes de biología celular, han permitido profundizar el estudio de la apoptosis en espermatozoides. La apoptosis es un modo de muerte celular programada, basado en un mecanismo genético que induce una serie de alteraciones celulares, morfológicas y bioquímicas que llevan al suicidio celular sin provocar una respuesta inflamatoria, involucra una serie de mensajeros intracelulares que terminan en la fragmentación del DNA. Existen marcadores tempranos como la fosfatidilserina y tardíos como la activación de caspasa 3 y la fragmentación del DNA.

Los últimos modelos de apoptosis, incluyen rutas mediadas por receptores y desencadenada de forma intrínseca. La unión de ligandos como Fas-L activa los receptores de muerte (CD95, Fas), resultando en trimerización y acoplamiento con proteínas adaptadoras (FADD) para formar complejos de señales que inducen la muerte (DISC). El receptor Fas (CD95) es una molécula de superficie celular glucosilada de aproximadamente 45 a 52 kDa. DISC transduce la señal de apoptosis mediante la activación de las caspasas (cisteína citosólica que contiene proteasas específicas de aspartato) que son una familia de proteasas altamente específicas, que contienen un aminoácido de cisteína en sus sitios activos.

Dos grupos de caspasas pueden ser diferenciados: iniciadores (CP 2, 8, 9, 10) y caspasas efectoras (CP 3, 6, 7). La caspasa 8 se identificó como la enzima iniciadora más importante por DISC. CP3, ejecuta el desmontaje final de la célula mediante la escisión de una variedad de proteínas de la estructura celular. Por último, la caspasa activada DNasa (CAD) o endonucleasa genera la ruptura del DNA, resultando en disminución de la fertilidad masculina. Por lo tanto, el uso de espermatozoides que están en vías de los

procesos de apoptosis, debe ser reducida al mínimo en las técnicas de fertilización asistida.

PREPARACIÓN Y SELECCIÓN ESPERMÁTICA

La remoción del plasma seminal es importante, debido a que contiene prostaglandinas, que de ser inyectadas directamente en la cavidad uterina durante una inseminación intrauterina, puede generar la presencia de contracciones uterinas. Por otra parte, el plasma seminal contiene estabilizadores de la membrana espermática y previene la capacitación e hiperactivación, eventos que normalmente presiden la reacción acrosómica, la cual es necesaria para una exitosa invasión del ovocito.¹⁵ Una eficiente separación de éste complejo fluido es un requerimiento fundamental para fertilización in vitro (IVF).

Múltiples métodos se han desarrollado para separar a los espermatozoides del plasma seminal, incluyendo el swim-up, migración por sedimentación, filtración por cristal de lana y el atrapamiento de espermias. El más comúnmente usado es la centrifugación por densidad de gradientes discontinuas (DGC) a través de una suspensión de polivinilpirrolidona o coloide con partículas de sílice recubiertas con silano. Este procedimiento se basa principalmente en las diferencias de densidad, los espermatozoides con morfología normal, las cabezas ovals con cromatina altamente compactada y limitado citoplasma residual, migran a regiones de alta densidad del gradiente.¹⁶

Un nuevo sistema de filtración electroforética basado en la membrana, que rápida y efectivamente aísla los espermatozoides con mínimo daño al DNA, el último prototipo para este propósito es el Cell Sorter 10 (CS-10), basado en el principio que los espermatozoides con mejor calidad conllevan una mayor red de carga negativa.¹⁷

ESTRATEGIAS AVANZADAS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA

Se definen como principios sofisticados, que emplean procedimientos de selección fisiológica, estos se basan ya sea en una evaluación más rigurosa de la morfología de los

espermatozoides, o en características moleculares de espermatozoides maduros, asociados a un correcto funcionamiento celular e integridad genómica. Actualmente, dichos procedimientos se puede dividir en tres grupos:

- Evaluación morfológica sofisticada
- Carga eléctrica
- Unión molecular

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA SOFISTICADA

La selección basada en la morfología de los espermatozoides en base a los criterios estrictos de Kruger (Tabla 2) a 1000x de magnificación es considerado como un buen predictor de éxito para fertilización in vitro.¹⁸

Rango de Referencia Normal	> 14 %
Cabeza	
Forma	Oval, con bordes suaves
Acrosoma	40 - 70% de la superficie
Tamaño	3 - 5 μm de largo 2 - 3 μm de ancho
Vacuolas	Hasta 4
Cuello	
Forma	Delgado, recta, regular Arqueado axialmente
Tamaño	< 1 μm ancho Largo de 1.5x cabeza
Gotas citoplásmicas	<1/2 del área de la cabeza
Cola	
Apariencia	Uniforme, desenrollada
Ancho	Más delgada que el cuello
Largo	10x cabeza

Tabla 2. Criterios estrictos de Kruger

En ICSI sin embargo, el embriólogo elige el más normal en base a aumentos de 400x en microscopio de luz, con muestras no fijadas, sin teñir. El Examen Morfológico de Organos del Espermatozoide Móvil (MSOME), evalúa la morfología con un aumento digital mayor de x6300, usando contraste de interferencia de Nomarski, se observa la

lámina post-acrosomal, cuello, mitocondrias, flagelo y el núcleo del espermatozoide, en este último la forma, así como la presencia y tamaño de las vacuolas.

La combinación de MSOME e ICSI ha sido nombrado Inyección de Espermatozoide Seleccionado por Morfología Intracitoplásmica (IMSI). En comparación con los procedimientos estándar de ICSI, IMSI ha demostrado no sólo aumentar las tasas de fertilización, sino también las tasas de implantación y embarazo.

CARGA ELÉCTRICA

Durante la maduración dentro del epidídimo, los espermatozoides humanos adquieren tres formas glucopéptidos gp20/CD52 anclados a lípidos, de alto sializado y carga negativa. De acuerdo a la carga eléctrica negativa, es posible separar a los espermatozoides por medio del llamado potencial zeta y la técnica electroforética. La carga eléctrica (-16 mV a -20 mV) del plasma de la membrana se llama potencial electrocinético o potencial zeta y no debe confundirse con el potencial de membrana.

El método zeta es un método sencillo para el aislamiento del espermatozoide maduro, por lo que le permite adherirse a la superficie de un tubo de ensayo con carga positiva. Se ha comprobado que el método selecciona espermatozoides con DNA y acrosoma intactos de muestras en criopreservación y aumenta la tasa de fecundación tras ICSI.

UNIÓN MOLECULAR

Actualmente contamos con dos métodos de unión molecular, la unión de espermatozoides a la anexina V y Ácido Hialurónico (HA).

ACIDO HIALURÓNICO

Las membranas de los espermatozoides maduros presentan exposición de receptores de HA. El Ácido hialurónico enlazado a espermatozoides presentan un menor porcentaje de aneuploidías cromosómicas y daño del DNA y muestran significativamente mejor morfología general y nuclear, así como una alta calidad del embrión resultante de ICSI.¹⁹

A pesar de estos resultados positivos Berg et al.²⁰ no encontraron diferencias significativas en las tasas de fertilización. Hasta la fecha, dos métodos de unión a HA están en uso, llamados toma de espermatozoide para ICSI (PICSI) y el medio que contiene ácido hialurónico.

El plato de PICSI, es una placa de Petri que tiene puntos de HA inmovilizado sobre ella, suspensiones de espermatozoide preparados con lavado o densidad de gradiente, se colocan en la parte superior de estos puntos de HA y se incuban durante 15 min a 37°C. Posteriormente, los espermatozoides que se encuentran libres en movimiento, son eliminados mediante enjuagando suave. Finalmente, los espermatozoides adheridos se pueden tomar (Picked) con una pipeta de ICSI (PICSI).

El medio con ácido hialurónico, contiene una gotita de 5- μ l de espermatozoide preparado por densidad de gradiente conectado a una punta de pipeta con una gotita de 5- μ l de medio para espermatozoide arrastrando a la suspensión en contacto y se incuban durante 15 min a 37°C bajo aceite. Los espermatozoides unidos a HA en la interfase de las dos gotas son seleccionados con una pipeta para ICSI.

ANEXINA V

La Anexina V es una proteína 35kDa, que se une a la fosfatidil serina (PS) negativamente cargada, que se acumula sobre la pared interna de la membrana plasmática de las células viables. Como una de las primeras señales de apoptosis, la PS se desplaza desde el interior hacia la cara externa de la membrana plasmática,²¹ indicando que la célula espermática es inapropiada para la fertilización. Por otro lado, la PS también se transloca durante los procesos de capacitación y reacción acrosomal,²² su translocación a la membrana externa se correlaciona positivamente con daño en el DNA nuclear, lo que reflejaría un fracaso para la fertilización y reproducción asistida.

SEPARACIÓN MAGNÉTICA CELULAR

La técnica de aislamiento celular, a través de un imán activado, fue desarrollada inicialmente por el grupo Glander en Leipzig, Alemania. Ofrece ventajas en cuanto a la

simplicidad de la técnica, bajo costo, especificidad y sensibilidad proporcionada por el uso de reactivos inmunoespecíficos.

Se basa en el uso de MicroBeads (MB) que son partículas superparamagnéticas de aproximadamente 50 nanómetros de diámetro, conjugadas con proteínas o anticuerpos. No son visibles con microscopía de luz, son biodegradables y son benévolas con la célula. La adición de compuestos oxido de hierro (maghemita ferro magnética $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y magnetita Fe_3O_4) a esferas de poliestireno monodispero, es la técnica típica de producción de MB.²³ Los Dynabeads fueron las primeras partículas magnéticas usadas clínicamente para separar células, particularmente médula ósea de gliomas previo a trasplante.

El uso de campos magnéticos de alto gradiente, son requeridos para separar físicamente las células en función de si están o no marcadas, gracias a un intenso campo magnético creado en la matriz de la columna, aproximadamente 1 tesla (10,000 gauss) y los gradientes locales de hasta 1000 tesla por metro, suficiente para retener las células unidas con una mínima cantidad de MB.²⁴

Las columnas MiniMACS por Miltenyi Biotec fueron específicamente diseñadas para generar este fuerte campo magnético (Figura 2)²⁵, mientras se mantiene una función y viabilidad celular óptima. Al bañar la columna con un buffer, las células no marcadas son bañadas, sin dañar a la fracción marcada así asegurando una óptima recuperación.

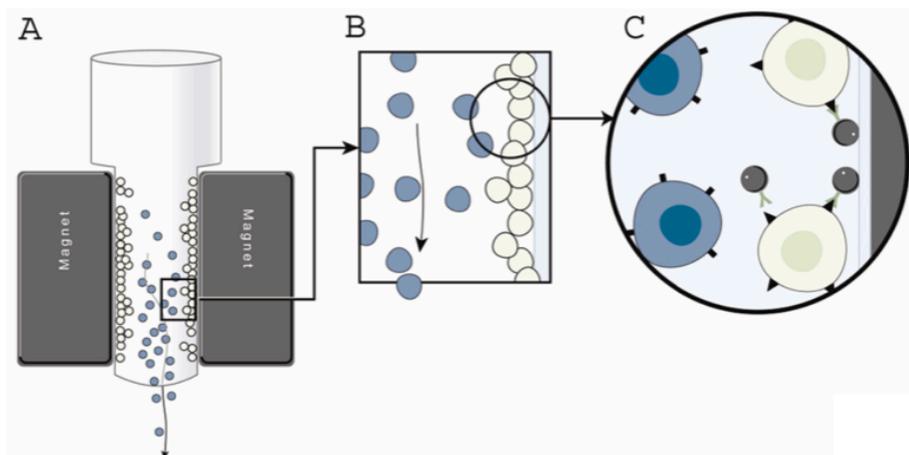


Figura 2. A) El soporte sólido se compone de esferas sub-milimétricas hechas de una aleación de acero suave. Un campo magnético externo magnetiza el soporte sólido, que atrae a las células marcadas magnéticamente aplicadas a la columna. B) Una lámina delgada a través del soporte sólido muestra espacios intersticiales disponibles para el flujo de la mezcla de células. C) Las células sin marcar fluyen libremente a través de la columna, mientras que las células marcadas magnéticamente se retienen dentro de la columna.

La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina, pero no cuenta con la habilidad de atravesar la membrana espermática intacta. Al conjugarla con microesferas paramagnéticas, se eliminan los espermatozoides apoptóticos, al permitir su unión a ellos seguido por su remoción subsiguiente por un campo magnético externo. Los no apoptóticos (Anexina V-negativos) pasan a través de la columna de selección. El procedimiento no sólo elimina a los espermatozoides apoptóticos de manera eficiente, ofrece un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides con morfología normal, sin alteración del potencial de la membrana mitocondrial, y menos daño en el DNA.²⁶

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿El uso de dos pruebas de capacitación espermática como son swim-up y la separación celular magnética por columnas de Anexina V mejoran el porcentaje de fertilización y los parámetros embrionarios en comparación con el uso de una sola prueba de capacitación espermática para la fertilización de ovocitos humanos con técnicas de reproducción asistida avanzada (IVF e ICSI) en parejas con infertilidad?

JUSTIFICACIÓN

Nuevas técnicas de capacitación espermática deben ser desarrolladas para alcanzar una muestra seminal óptima que mejore los porcentajes de fertilización y embarazo. Por lo tanto, no solo las características físicas y morfológicas deben ser tomadas en cuenta sino también las características moleculares de los espermatozoides, lo que permita obtener mejores resultados. De acuerdo con las últimas publicaciones, parece que la mejor forma de capacitar una muestra de semen es mediante la combinación de dos pruebas de capacitación espermática incluyendo la separación celular magnética por columnas de Anexina V.²⁷

El uso de dos pruebas, ha demostrado un beneficio en las características del semen del humano,²⁸⁻²⁹ sin embargo, ningún estudio ha analizado el verdadero impacto de la combinación de ambas técnicas en la fertilización del ovocito humano y su desarrollo embrionario posterior.

Será de mucha utilidad conocer si el uso de ambas técnicas de capacitación espermática mejorará el porcentaje de fertilización y los parámetros de desarrollo embrionario temprano para lograr mejores resultados en las técnicas de reproducción asistida avanzada de acuerdo a la morfología espermática.

OBJETIVOS E HIPOTESIS

OBJETIVO GENERAL:

- Comparar la tasa de fertilización y el desarrollo embrionario en técnicas de reproducción asistida avanzada, como son ICSI e IVF en dos preparaciones seminales como swim-up y la separación celular magnética por columnas de Anexina V, de acuerdo a la morfología espermática.

OBJETIVO ESPECIFICOS:

- Evaluar el uso de dos preparaciones seminales en el porcentaje de fertilización y los parámetros embrionarios tempranos posterior a la fertilización de ovocitos humanos mediante el uso fertilización in-vitro.
- Evaluar el uso de dos preparaciones seminales en el porcentaje de fertilización y los parámetros embrionarios tempranos posterior a la fertilización de ovocitos humanos mediante el uso de la inyección intracitoplasmática de un espermatozoide.
- Comparar el uso de dos preparaciones seminales en el porcentaje de fertilización y los parámetros embrionarios tempranos, en relación a la morfología espermática de acuerdo a los criterios de Kruger.

HIPÓTESIS

- La combinación de dos preparaciones seminales como son swim-up y la separación celular magnética por columnas de Anexina V y de acuerdo a la morfología espermática, se mejora el porcentaje de fertilización y los parámetros de desarrollo embrionario tempranos posterior a la fertilización de ovocitos humanos con dichas muestras seminales en técnicas de reproducción asistida avanzada en parejas con infertilidad.

METODOLOGÍA

4.1. LUGAR Y DURACION

CENTRO DE REPRODUCCIÓN ARCOS S.C.

4.2. UNIVERSO, METODOS DE MUESTREO, Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.

4.2.1 Universo: Parejas infértiles sometidas a técnicas de reproducción asistida avanzada.

4.2.2 Métodos de muestreo: De forma aleatoria, se eligieron a parejas infértiles sometidas a una doble preparación seminal (grupo de estudio) y a aquellas que serán sometidas a solo un tipo de preparación seminal (grupo control). En el grupo de estudio, posterior a la entrega de la muestra seminal, ésta fue sometida a swim-up y a la separación celular magnética por columnas de Anexina V. En el grupo control, la muestra seminal fue solamente sometida a swim-up. En cada grupo la morfología espermática se evaluó según los criterios estrictos de Kruger (**Tabla 2**) Posteriormente, independientemente de la forma de preparación de la muestra seminal, los ovocitos de la pareja fueron fertilizados en un 50% mediante fertilización in-vitro y 50% mediante el uso de ICSI. (**Figura 3**) Al día siguiente, 18-24 horas posterior a la inseminación, se verificó el porcentaje de fertilización y eventualmente, al segundo y tercer día, se valoraron los marcadores tempranos de desarrollo embrionario: i) división embrionaria (número de células), ii) porcentaje de fragmentación y iii) multinucleación. Finalmente, la muestra espermática se clasificó en 3 grupos de acuerdo a la morfología espermática, basada en los criterios estrictos de Kruger: a) 1 - 4%, b) 5 - 10% y c) 11 - 16% de normalidad. En cada grupo, se evaluó la tasa de fertilización, división embrionaria, calidad embrionaria, fragmentación y embriones multinucleados. Los embriones con mejor calidad se transfirieron en el día 3 de desarrollo embrionario independientemente de la preparación seminal que se utilizó.

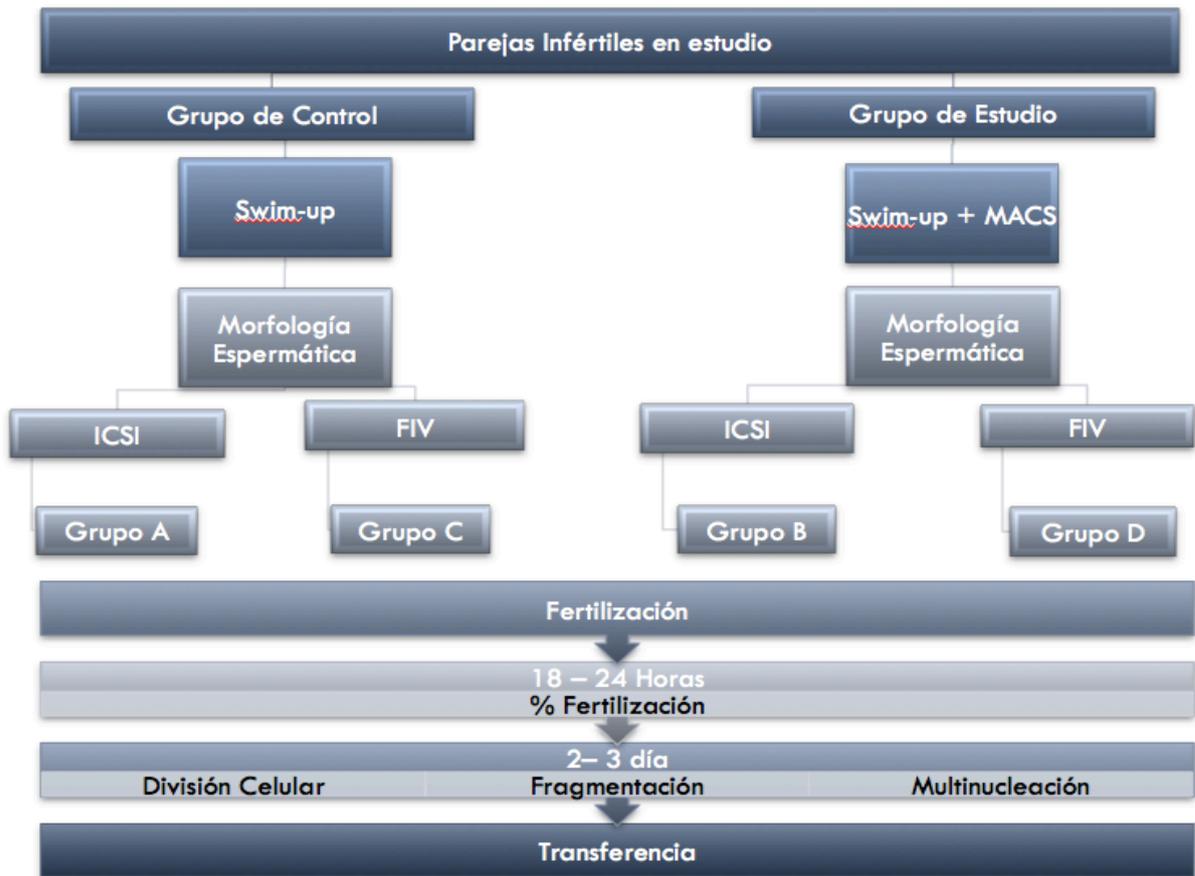


Figura 3. Diseño general del estudio que muestra las diferentes etapas llevadas a cabo en nuestro estudio.

4.2.3 Tamaño de la Muestra: Al ser un estudio piloto. Se evaluaron todas las parejas infértiles que acudieron durante el periodo ya establecido (julio 2012 - diciembre 2012) a protocolos de reproducción asistida avanzada. Incluyéndose un total de 32 parejas que cumplieron los criterios de inclusión, con una muestra final de 387 ovocitos en metafase II.

4.3. CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION.

INCLUSION

- Parejas con infertilidad sometidas a técnicas de reproducción asistida avanzada en el Centro de Reproducción Arcos de julio del 2012 a diciembre del 2012.
- Espermocultivo negativo.
- Muestra seminal con cuenta leucocitaria menor a 1×10^6 /ml.
- Pacientes con menos de 2 días y más de 5 días de abstinencia sexual.
- Pacientes con una concentración espermática mayor a 10 millones/ml.
- Cultivos vaginales negativos para *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Ureoplasma*.
- PAP: negativo para células neoplásicas.
- Transferencia sin alteraciones.

EXCLUSION

- Pacientes con baja reserva ovárica.
- Pacientes sometidas a protocolos de donación de óvulos.
- Pacientes con endometriosis severa.
- Pacientes que no acepten participar en el estudio.
- Pacientes que padezcan enfermedades crónico-degenerativas o sistémicas.
- Pacientes con captura ovocitaria menor a 5 ovocitos por ciclo

VARIABLES DEL ESTUDIO

INDEPENDIENTE

- Preparación seminal a base de swim-up y separación celular magnética por columnas de Anexina V.
- Definición operacional: Se realizará una selección del espermatozoide de mejor calidad a través del uso de swim-up con el uso posterior de columnas magnéticas de Anexina V. Con ello, se eliminarán los espermatozoides en apoptosis y aquellos con baja movilidad además de detritos celulares.

DEPENDIENTE

- Porcentaje de fertilización.
- Definición operacional: Se corroboró la fertilización de los ovocitos mediante su observación a través del microscopio 18 - 24 horas posteriores a la FIV o ICSI. Reconociendo la presencia de un segundo cuerpo polar y la presencia de dos pronúcleos.
- Marcadores tempranos del desarrollo embrionario.
- Definición Operacional: Los marcadores tempranos del desarrollo embrionario fueron evaluados bajo el microscopio en 2 diferentes etapas del desarrollo: i) etapa pronuclear (16-18 horas posteriores a la FIV o ICSI), ii) día 2 y 3 del desarrollo embrionario (etapa de división celular)
- Etapa Pronuclear: valoración microscópica 18 horas posterior a la FIV o ICSI:
 - Número de Pronúcleos: cantidad de pronúcleos dentro del ovocito fertilizado. Se reportará como óvulo fertilizado aquel que tenga más de 2 pronúcleos en su interior.
 - La presencia de 2 cuerpos polares es otro dato de fertilización.

- Etapa de división celular días 2 y 3 del desarrollo embrionario:
 - Número de células: El número de células visualizadas refleja el ritmo de división de los embriones y es un indicador de la capacidad de desarrollo e implantación.
 - Equicorporalidad y número de blastómeras: número de células o blastómeras de igual o diferente tamaño.
 - Fragmentación: presencia de fragmentación en el embrión y su porcentaje en relación al volumen total del embrión.
 - Clasificación de Veek: (Figura 3)

Valora el número de células, simetría y la fragmentación. El grado 1 presenta blastómeras de igual tamaño sin fragmentación citoplásmica, tiene el mejor puntuación. El grado 2 tiene blastómeros simétricas con poca fragmentación citoplásmica, $\leq 10\%$ de la superficie. El grado 3 al 5 muestran progresión en la fragmentación citoplásmica con simetría variable celular.

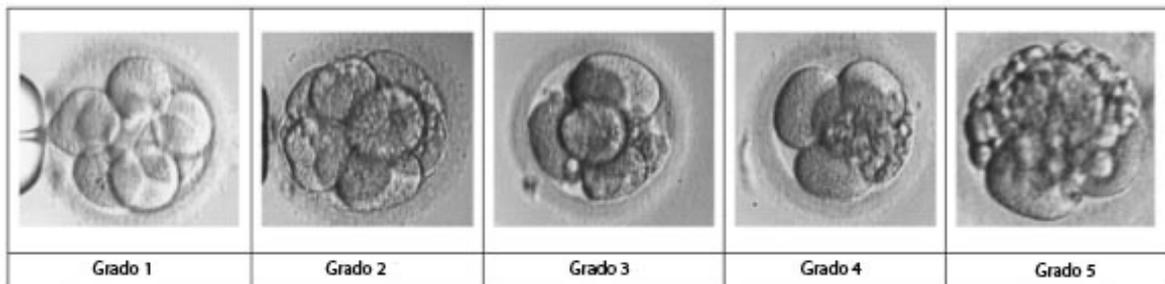


Figura 3. Esquema de la clasificación de embrión en división.

- Morfología espermática.
- Definición Operacional: Se evaluaron las muestras espermáticas bajo microscopio de acuerdo a los criterios morfológicos estrictos de Kruger (Tabla 2) posterior a la capacitación de la muestra seminal por swim-up y swim-up + MACS.

Cabeza	
Forma	Oval, con bordes suaves
Acrosoma	40 - 70% de la superficie
Tamaño	3 - 5 μm de largo 2 - 3 μm de ancho
Vacuolas	Hasta 4
Cuello	
Forma	Delgado, recta, regular Arqueado axialmente
Tamaño	< 1 μm ancho Largo de 1.5x cabeza
Gotas citoplásmicas	<1/2 del área de la cabeza
Cola	
Apariencia	Uniforme, desenrollada
Ancho	Más delgada que el cuello
Largo	10x cabeza

Tabla 2. Criterios estrictos de Kruger.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

FECHA DE INICIO: JULIO DEL 2012.

FECHA DE TERMINACION: DICIEMBRE DEL 2012.

Nº.	ACTIVIDAD	MES CALENDARIO PROGRAMADO											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	DISEÑO Y DESARROLLO TÉCNICO	X											
	RECOLECCIÓN DE DATOS		X	X	X								
	PROCESAMIENTO DE DATOS				X	X							
	ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN					X	X						
	REDACCIÓN DEL INFORME FINAL					X	X						
	ELABORACIÓN DE ARTÍCULO						X						

ASPECTOS ETICOS

I. Investigación sin riesgo.

II. Investigación con riesgo mínimo.

III. Investigación con riesgo mayor al mínimo.

(A continuación se presenta un ejemplo).

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

5.1 ANALISIS ESTADISTICO

Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para probar que los datos provienen de la misma población y se utilizó el análisis de varianza para comparar distintos parámetros entre las cuatro alicuotas experimentales mediante la prueba exacta de Fisher o X^2 . Todas las pruebas fueron de dos variables y son significativas cuando la $p < 0.05$.

5.2 RESULTADOS

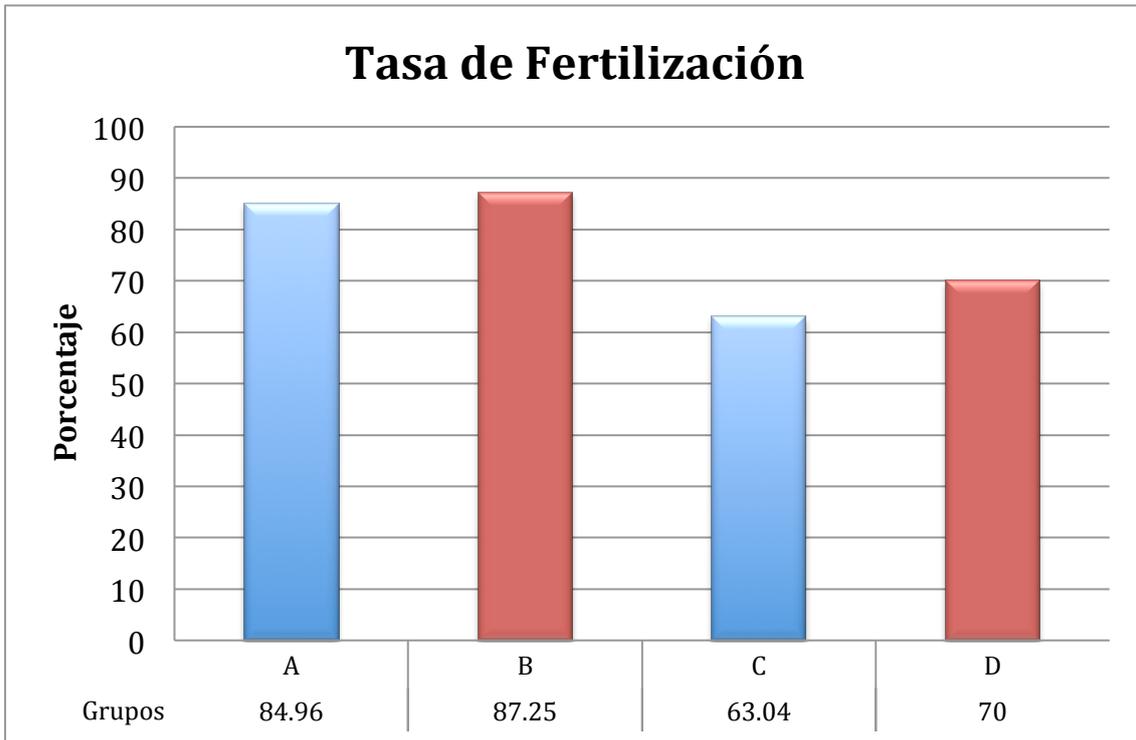
El resumen de los resultados se muestran en la **Tabla 3**. Se observa específicamente, tasas de fertilización, evaluación de marcadores tempranos del 1er trimestre y embriones transferidos por grupo.

5.2.1 EVALUACIÓN DE FERTILIZACIÓN

En la **Gráfica 1**, podemos observar que la tasa de fertilización en pacientes sometidas a la misma técnica de reproducción asistida (FIV ó ICSI) fue similar (ICSI SU: 84.46% vs ICSI MACS+SU 87.25%, $p= 0.6892$; FIV SU: 63.04% vs FIV MACS+SU 70.0%, $p=0.3488$) independientemente de la forma en que la muestra seminal fue preparada (grupo de estudio: MACS + swim-up vs grupo control: swim-up). Sin embargo, la tasa de fertilización fue significativamente mejor cuando comparamos FIV vs ICSI (ICSI SU: 84.46% vs FIV SU: 63.04%, $p<0.05$; ICSI MACS+SU 87.25% vs FIV MACS+SU 70.0%, $p<0.05$), sin importar el método de preparación seminal.

Al analizar la tasa de fertilización de acuerdo a la morfología espermática según los criterios estrictos de Kruger (grupo a: 0-4%, grupo b: 5-10% y grupo c: >10%), no encontramos ninguna diferencia entre los grupos de estudio y control (**Tabla 4**). Sin embargo, en el grupo con teratozoospermia (morfología de Kruger <4%), aunque la diferencia no es significativa, se observa un claro aumento en las tasas de fertilización en

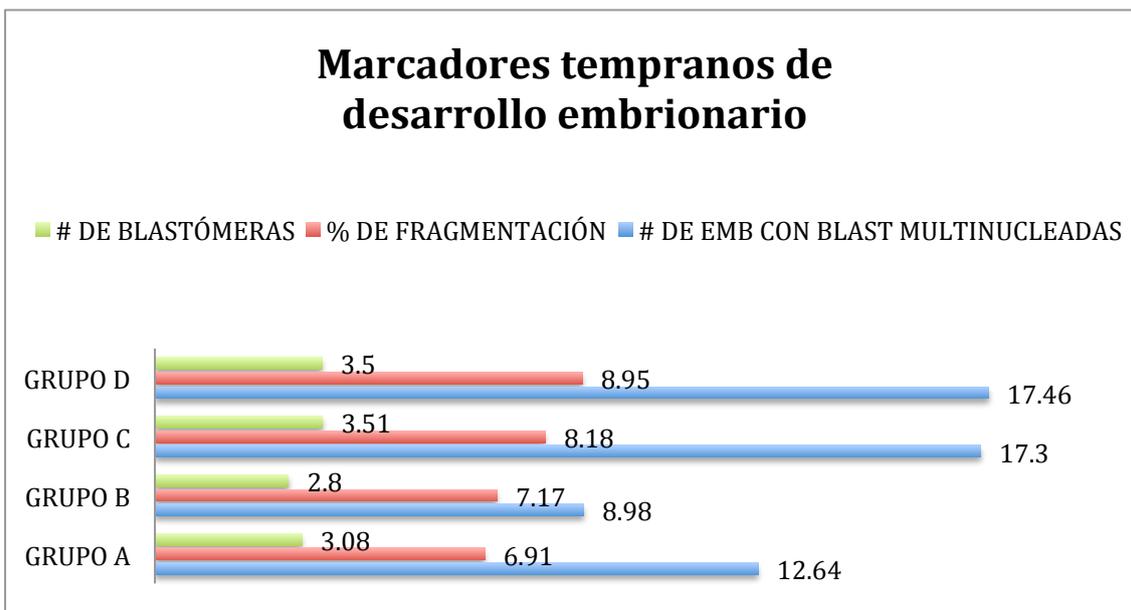
ambas técnicas de reproducción asistida (FIV e ICSI) cuando se utilizaron dos preparaciones seminales (ICSI SU: 78.57% vs ICSI MACS+SU 85.71%, $p>0.5$; FIV SU: 36.36% vs FIV MACS+SU 53.84%, $p>0.5$).



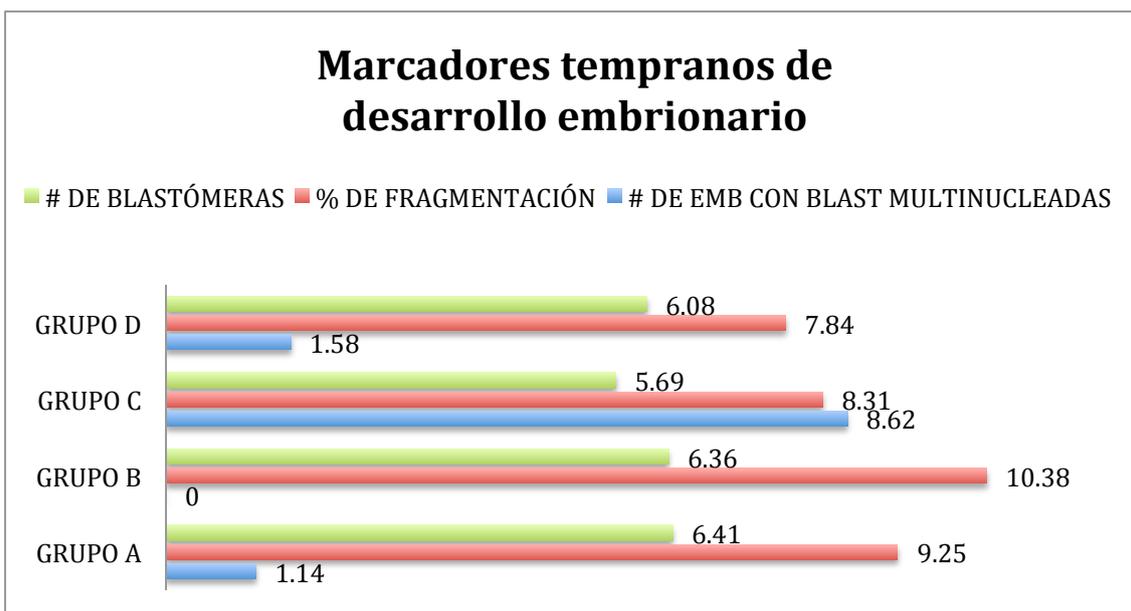
Grafica 1. Tasa de Fertilización a las 18 horas de los dos grupos de estudio: B y D (ICSI/ MACS+SU; FIV/MACS+SU, respectivamente) y los dos grupos control: A y C (ICSI/SU; FIV/SU, respectivamente).

5.2.2 MARCADORES TEMPRANOS DE DESARROLLO EMBRIONARIO

En el día 2 de desarrollo embrionario, el promedio de división celular en los grupos A, B, C y D fue de 3.5, 3.51, 2.8 y 3.08 blastómeras, respectivamente. Para el tercer día de desarrollo embrionario, el promedio de células presentes fue de 6.41, 6.36, 5.69 y 6.08, respectivamente. La calidad de los embriones se realizó basándose en los criterios de Veek, tomando en cuenta el porcentaje de fragmentación siendo éste de 6.91%, 7.17%, 8.18% y 8.95% en el día 2 y 9.25%, 10.38%, 8.31% y 7.84% para el día 3, respecto a los grupos A, B, C y D. El porcentaje de embriones con blastómeras multinucleadas fue mayor en el día 2 encontrándose de 12.64%, 8.98%, 17.30% y 17.46%, en los grupos A, B, C y D, disminuyendo al día 3 en 1.14%, 0%, 8.62% y 1.58%, respectivamente. (Tabla 3, Gráfica 2, 3).



Gráfica 2. Marcadores tempranos de desarrollo embrionario en día 2. EMB: embriones; BLAST: blastómeras. Grupo A: Swim-up con ICSI, Grupo B: MACS + Swim-up con ICSI, Grupo C: Swim-up con FIV y Grupo D: MACS + Swim-up con FIV.



Gráfica 3. Marcadores tempranos de desarrollo embrionario en día 3. EMB: embriones; BLAST: blastómeras. Grupo A: Swim-up con ICSI, Grupo B: MACS + Swim-up con ICSI, Grupo C: Swim-up con FIV y Grupo D: MACS + Swim-up con FIV.

GRUPOS		A	B	C	D
		ICSI-SU	ICSI-MACS	FIV-SU	FIV-MACS
DIA 1	# DE ÓVULOS M2	103	102	92	90
	TASA DE FERTILIZACIÓN	87/103 84.46%	89/102 87.25%	58/92 63.04%	63/90 70.00%
DIA 2	# DE CÉLULAS	3.5	3.51	2.8	3.08
	CALIDAD	2.79	2.73	2.71	2.62
	% DE FRAGMENTACIÓN	6.91	7.17	8.18	8.95
	# DE EMBRIONES CON BLATÓMERAS MULTINUCLEADAS	11/87 12.64%	8/89 8.98%	9/52 17.30%	11/6 17.46%
DIA 3	# DE CÉLULAS	6.41	6.36	5.69	6.08
	CALIDAD	2.9	2.85	2.9	2.89
	% DE FRAGMENTACIÓN	9.25	10.38	8.31	7.84
	# DE EMBRIONES CON BLASTÓMERAS MULTINUCLEADAS	1/87 1.14%	0/89 0%	5/58 8.62%	1/63 1.58%
TX	# DE EMBRIONES TRANSFERIDOS	24	32	21	13
	% DE EMBRIONES TRANSFERIDOS	24/87 27.58%	32/89= 5.95%	21/58 36.20%	13/63 20.63%
	PROMEDIO DE EMBRIONES TRANSFERIDOS	2.81			
	% DE EMBARAZO	18/32=56.25%			

Tabla 3. Resultados de fertilización y marcadores tempranos de desarrollo embrionario generales en el grupo de estudio y control.

5.2.3. MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA

De acuerdo al porcentaje de normalidad utilizando los criterios estrictos de Kruger, las muestras espermáticas se dividieron en 3 subgrupos, como se muestra en la **Tabla 4**. Adicionalmente, se muestran los marcadores de desarrollo embrionario en el día 3 de acuerdo a cada uno de los subgrupos. La tasa de fertilización en pacientes con

teratozoospermia (morfología <4%, de acuerdo a criterios estrictos de Kruger), fue de 78.57%, 85.71%, 36.36% y 53.84% para los grupos A, B, C y D, respectivamente. que fue estadísticamente significativa $p > 0,05$. Como se mencionó anteriormente, aunque la diferencia no es significativa, se observa un claro aumento en las tasas de fertilización en ambas técnicas de reproducción asistida (FIV e ICSI) cuando se utilizaron dos preparaciones seminales (ICSI SU: 78.57% vs ICSI MACS+SU 85.71%, $p > 0.5$; FIV SU: 36.36% vs FIV MACS+SU 53.84%, $p > 0.5$).

PORCENTAJE	1 - 4% MORFOLOGÍA				5 - 10% MORFOLOGÍA				11 - 16% MORFOLOGÍA			
GRUPO	A ICSI-SU	B ICSI-MACS	C FIV-SU	D FIV-MACS	A ICSI-SU	B ICSI-MACS	C FIV-SU	D FIV-MACS	A ICSI-SU	B ICSI-MACS	C FIV-SU	D FIV-MACS
# DE ÓVULOS MII	14	14	11	13	58	56	54	47	31	32	27	30
TASA DE FERTILIZACIÓN	11/14 78.57%	12/14 85.71%	4/11 36.36%	7/13 53.84%	53/58 91.37%	50/56 89.28%	37/54 68.51%	37/47 78.72%	23/31 74.19%	27/32 84.37%	20/27 74.07%	21/30 70.00%
# DE PACIENTES	6	6	6	6	16	16	16	16	10	10	10	10
# DE CÉLULAS	6.36	6.8	5.25	5	6.42	5.97	5.58	6.2	6.42	6.73	5.94	6.29
CALIDAD	3	2.97	3.25	3.33	2.92	2.79	2.77	2.74	2.86	2.89	3.01	3.06
FRAGMENTACIÓN	7.09	9.16	6.5	14.16	8.1	10.23	6.92	7.37	12.07	11.35	10.56	7.21
# DE EMBRIONES MULTINUCLEADOS	0	0	1	0	1	0	4	0	0	0	0	1
# DE EMBRIONES TRANSFERIDOS	6	7	1	1	13	15	13	6	5	10	7	6
% DE EMBRIONES TRANSFERIDOS	6/11 54.54%	7/12 58.33%	1/4 25%	1/7 4.28%	13/53 24.52%	15/50 30%	13/37 35.13%	6/37 16.21%	5/23 21.73%	10/27 37.03%	7/20 35%	6/21 28.57%
PROM DE EMBRIONES TRANSFERIDOS	2.5				2.93				2.8			
% DE EMBARAZO	2/6 33.33%				11/16 68.75%				5/10 50%			

Tabla 4. Resultados de Fertilización y Marcadores Tempranos de Desarrollo Embrionario de acuerdo a la Morfología Espermática.

DISCUSIÓN Y ANALISIS DE RESULTADOS

Las últimas 2 décadas se han distinguido por un aumento constante en el uso de técnicas de reproducción asistida para el tratamiento de la infertilidad masculina y femenina. A pesar de los avances, las tasas de éxito aún pueden mejorarse. La identificación y selección de los espermatozoides con el potencial suficiente de fertilización es una estrategia que podría ser utilizada para mejorar las tasas de éxito.

La selección de los espermatozoides humanos en las técnicas de reproducción asistida, se basa actualmente en criterios como viabilidad, movilidad y morfología; estos criterios excluyen claramente anomalías espermáticas a nivel molecular, lo que puede afectar la fertilización. Anomalías tales como la fragmentación del DNA y la señalización de apoptosis, han estado directamente vinculados a alteraciones en la fertilización, por lo que detectar y separar espermatozoides con este tipo de alteraciones puede favorecer la tasa de fertilización y la calidad del desarrollo embrionario.

Recientemente, una nueva técnica de capacitación espermática ha sido estandarizada. En este modelo, se combinan dos técnicas de preparación espermática: i) el uso de anexina V asociado a MACS y ii) la ya conocida técnica de swim-up. Por tanto, los espermatozoides no solo se separan en base a sus características físicas sino también respecto a sus características moleculares, teniendo como objetivo los espermatozoides con membranas alteradas que externalizan fosfatidilserina, como manifestación de apoptosis.

Este es el primer estudio prospectivo, clínicamente aleatorizado realizado en humanos, que evalúa las tasas de fertilidad y marcadores de desarrollo embrionario tempranos, utilizando muestras seminales con preparación por anexina V asociada a MACS que compara resultados en técnicas de reproducción asistida: IVF e ICSI, tomando en cuenta la morfología de Kruger. Estudios previamente realizados con muestras de semen de donantes sanos mostraron que la anexina V asociada a MACS permite la selección de espermatozoides no apoptóticos con resultados óptimos mediante la combinación con doble centrifugación por densidad de gradientes.

En 2005, Said y colaboradores²⁷ realizaron un estudio en 15 donadores, sometiendo las muestras seminales a doble centrifugación por densidad de gradientes como control y a MACS en el grupo de estudio. Posteriormente, se valoró por citometría de flujo, caspasa 3 activada, integridad de la membrana mitocondrial y externalización de fosfatidilserina, así como la morfología de Kruger. No hubo diferencias significativas en ambos grupos respecto a la morfología espermática evaluada según los criterios de Kruger (grupo control: $8.14 \pm 3.23\%$ y el de estudio $8.38 \pm 3.48\%$). La caspasa 3 activada, la integridad de la membrana mitocondrial y el porcentaje de externalización de fosfatidilserina en el grupo control fueron de 20.75 ± 10.46 , 73.63 ± 16.33 , 4.56 ± 3.30 , respectivamente; y en el grupo de estudio de 6.79 ± 4.87 , 83.54 ± 11.50 y 4.56 ± 3.92 , respectivamente. Al comparar estas variables, se demostró una significativamente menor cantidad de marcadores apoptóticos en el grupo de estudio con una $p= 0.003$, así como un mayor porcentaje de integridad mitocondrial con una $p=0.05$.

En este estudio, se intentó evaluar el efecto de la integración de MACS en los protocolos de preparación espermática valorando el desarrollo embrionario y la tasa de fertilidad, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la tasa de fertilización entre los grupos de estudio y control, independientemente de la técnica de reproducción asistida utilizada durante la fertilización. En cuanto a la evaluación de los marcadores de desarrollo embrionario tempranos en el día 3, no se encontró una diferencia significativa en dos de las tres variables estudiadas: i) en la división celular en los grupos A vs B (6.41 vs 6.36) ó C vs D (5.69 vs 6.08), ii) en la fragmentación en los grupos A vs B (9.25% vs 10.38%) ó C vs D (8.31% vs 7.84%). Sin embargo, se encontró diferencia en el número de embriones con blastómeras multinucleadas en los grupos C vs D (8.62% vs 1.58%) que utilizaron la FIV como método de fertilización.

La aplicación de esta técnica en sujetos masculinos con teratozoospermia (morfología $<4\%$, según criterios estrictos de Kruger) en combinación con el método swim-up, demostró un incremento en la tasa de fertilización con ambas técnicas de reproducción asistida avanzada (FIV ó ICSI) en comparación con el uso del método swim-up de forma aislada. Sin embargo, este incremento no fue significativo, ya que se requiere de un tamaño de muestra más grande para demostrar una verdadera mejoría en el proceso de

fertilización, enfocándose en este grupo de pacientes que acuden por infertilidad, en los que MACS podría ofrecer un mejor panorama.

CONCLUSIONES

La infertilidad masculina relacionada a procesos de apoptosis ha sido asociada no sólo con un proceso de fertilización anómala, sino también con un desarrollo pobre del embrión, anomalías cromosómicas, y embriones pre-implantados no competentes. Por lo tanto, las líneas de investigación se han enfocado en la preparación seminal de mayor calidad, con el propósito de mejorar la calidad embrionaria. Este es el primer estudio prospectivo y clínicamente aleatorizado, que se basa en la utilización de anexina V asociado a MACS para seleccionar una muestra de semen sin espermatozoides en proceso de apoptosis temprana, buscando mejorar la tasa de fertilización y calidad embrionaria y tomando en cuenta la morfología espermática de acuerdo a los criterios de Kruger. El utilizar dos técnicas de preparación espermática no demostró ser una mejor opción en parejas con infertilidad sometidas a técnicas de reproducción asistida avanzada, sin embargo, en ciertos casos en los que el factor masculino influye en la fertilidad (pacientes con teratozoospermia) el uso de ambas técnicas parece tener un beneficio. Es importante continuar con nuevos protocolos de investigación que ayuden a demostrar el beneficio real de nuevas técnicas de selección espermática, basadas en criterios moleculares de apoptosis y enfocándose en parejas con infertilidad en las que el factor masculino sea determinante.

ANEXO A



México D.F. 10 de julio de 2012

DR. GERARDO BARROSO VILLA
SERVICIO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA
CENTRO MEDICO ABC
Presente

Me permito comunicarles que durante la más reciente sesión del Comité de Investigación del Centro Médico ABC, se presentó a consideración el protocolo que amablemente nos hizo llegar con el título de:

COMPARACION DE LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS CON EL USO DE ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS MEDIANTE SWIM-UP VS EL USO DE SWIM-UP ASOCIADA A SEPARACION CELULAR MAGNETICA POR COLUMNAS DE ANEXIMA V (MACS)

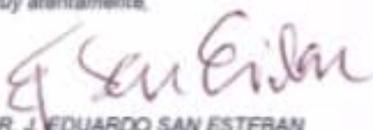
INVESTIGADOR: DR. GERARDO BARROSO VILLA

Proyecto de colaboración con la Fundación John Langdon Down AC

APROBADO PARA SU REALIZACION

NUMERO DE REGISTRO: ABC-12-10

Muy atentamente,


DR. J. EDUARDO SAN ESTEBAN
SUBJEFE DE INVESTIGACION
CENTRO MEDICO ABC

ANEXO B

CONSENTIMIENTO INFORMADO YO

(Nombre Completo de la Paciente o de su representante legal)
Y YO

(Nombre Completo de la Pareja)

declaramos libremente que estamos de acuerdo en participar (en que participe mi representado cuyo nombre aparece abajo) en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios, y riesgos se especifican en el Apartado A de este documento.

Es de nuestro conocimiento que los investigadores nos han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que, al momento de firmar la presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se nos ha manifestado que podemos retirar nuestro consentimiento de participar en cualquier momento sin que ello signifique que la atención médica que se nos proporcione, se vea afectada por este hecho.

Se nos ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se nos deba brindar y que toda la información que se otorgue sobre nuestra identidad y participación será confidencial, excepto cuando nosotros lo autoricemos.

Para los fines que se estime conveniente, firmamos la presente junto al investigador que nos informó y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Información proporcionada para obtener nuestra autorización.

Apartado A: El objetivo del estudio es evaluar el manejo de pruebas de capacitación espermática que permita mejorar el porcentaje de fertilización de los ovocitos así como mejorar la calidad del desarrollo embrionario. El estudio se basa en la combinación de dos técnicas de capacitación espermática para lograr mejores resultados en las técnicas de reproducción asistida avanzada. Los probables beneficios del estudio son mejorar el porcentaje de fertilización de los ovocitos obtenidos durante la captura ovocitaria y obtener mejores parámetros de desarrollo embrionario que permitan aumentar las tasas de implantación y embarazo. No existe ningún riesgo relacionado al uso de la combinación de dos pruebas de capacitación seminal como son swim-up y la separación celular magnética por columnas de Anexina V.

México D.F. a _____ de _____ de 2012.

	NOMBRE	FIRMA
PARTICIPANTE A		
PARTICIPANTE B		
REPRESENTANTE		
INVESTIGADOR		
TESTIGO		
TESTIGO		

REFERENCIAS

1. Heape W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. Proc R Soc 1891;48:457.
2. Austin CR. Observations of the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust J Sci Res 1951;134:581.
3. Chang MC. Fertilization capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes. Nature 1951;168:697.
4. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after implantation of a human embryo. Lancet 1978;2(8085):366.
5. Trouson AO, Leeton JF, Wood C, Webb J, Wood J. Pregnancies in humans by fertilization *in vitro* and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. Science 1981;212:681.
6. Lenz S, Lauritsen JG, Kjellow M. Collection of human oocytes for *in vitro* fertilization by ultrasonically guided follicular puncture. Lancet 1981;63:1.
7. Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, Sathananthan H, Chan CL, et al. Pregnancy after transfer of multiple sperm under the zona. Lancet 1988;2(8614):790.
8. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992;340(8810):17-18.
9. Trounson AO, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight cell embryo. Nature 1983;305:707.
10. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker Hw, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update. 2010;16(3):231-45.
11. Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. Arch Androl 2003; 49: 49-55.
12. Cooper TG, Yeung CH, Fetic S, Sobhani A, Nieschlag E. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. Hum Reprod 2004; 19: 2283-8.

13. Yeung CH, Barfield JP, Cooper TG. Physiological volume regulation by spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250: 98–105.
14. Yeung WS, Lee KF, Koistinen R, Koistinen H, Seppälä M et al. Effects of glycodefins on functional competence of spermatozoa. *J Reprod Immunol* 2009; 83: 26–30.
15. de Lamirande E. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:60–68.
16. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, Jr, Agarwal A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004;19:129–138.
17. Ainsworth C, Nixon B, Aitken RJ. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 2005;20:2261 – 2270.
18. Ashok A, Frances M. B, Edmund S. Assessing Sperm Function. *Urol Clin N Am* 35 (2008) 157–171
19. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalae M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25: 197–03.
20. van den Bergh MJ, Fahy-Deshe M, Hohl MK. Pronuclear zygote score following intracytoplasmic injection of hyaluronan-bound spermatozoa: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 2009; 19: 796–801
21. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger CP. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labelled annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 180: 39–52.
22. Gadella BM, Harrison RA. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 2002; 67: 340–50.
23. McCloskey KE, Chalmers JJ, Zborowski M. Magnetic cell separation: characterization of magnetophoretic mobility. *Anal Chem* 2003;75:6868–6874. [PubMed: 14670047]

24. Zhang H, Moore LR, Zborowski M, Williams PS, Margel S, Chalmers JJ. Establishment and implications of a characterization method for magnetic nanoparticle using cell tracking velocimetry and magnetic susceptibility modified solutions. *Analyst* 2005;130:514-527. [PubMed: 15776162]
25. Said TM, Agarwal A, Zborowski M, et al. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl.* 2008;29:134-42.
26. Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 2006; 74: 530-7.
27. Said TM, Grunewald S, Paasch U, et al. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online.* 2005;10:740-6.
28. Said TM, Grunewald S, Paasch U, et al. Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertil Steril.* 2005;83:1442-6.
29. Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, et al. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil Steril.* 2009;92:572-7.
30. Aziz N, Said T, Paasch U, et al. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Human Reproduction* 2007; 22-5:1413 - 19