



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**COMPARACIÓN DE LOS 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)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. ROBLEDO TREJO GONZALO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN GERARDO BARROSO VILLA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. GLORIA QUEIPO GARCIA

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX., OCTUBRE, 2021



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/866/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de junio de 2021 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de Biomedicina del estudiante ROBLEDO TREJO GONZALO con número de cuenta 302083866 con la tesis titulada "COMPARACIÓN DE LOS 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)", realizada bajo la dirección del DR. JUAN GERARDO BARROSO VILLA, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. SILVIA PATRICIA PÉREZ VERA
Vocal: DR. FABIAN JESÚS ARECHAVALETA VELASCO
Vocal: DRA. MAYEL DEL VALLE CHIRINOS ESPÍN
Vocal: DR. EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ
Secretario: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 9 de septiembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos

Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por permitirme realizar mis estudios de maestría permitiéndome dar continuidad a mi crecimiento académico.

Dr. Juan Gerardo Barroso Villa por su paciencia y tiempo para ayudarme a superar mis propias expectativas y hacerme un mejor investigador.

Dra. Gloria Queipo Garcia y Dr. Horacio Merchant Larios, quienes participaron como miembros de mi comité tutorial. Muchas gracias por su apoyo y tiempo. Sus comentarios y opiniones ayudaron al enriquecimiento y correcto desarrollo de este proyecto de investigación, fueron piedras angulares en mi desarrollo profesional.

Agradecimientos personales

A Dios, de ti provienen todas las cosas tanto si las comprendemos como si no.

A mis padres, mis mas grandes críticos y motivadores, gracias por su paciencia y por sus constantes enseñanzas que no tienen otro fin sino impulsarme a ser la mejor versión de mí.

A mi esposa, Fonsy, gracias por siempre decirme del modo tan especial que solo tú posees, lo que necesito oír.

Gracias a Ikuko y Monitaka con quienes siempre he podido contar, y especial a mis padres, quienes al día de hoy han sido un apoyo incondicional en todos los campos de mi vida y han batallado conmigo siempre en el ánimo de hacer de mí una mejor persona, y por supuesto a mis sobrinos, que espero se sientan motivados a seguir estudiando.

A Rous, mi mentora y amiga, gracias por darme la oportunidad de acercarme a este fascinante mundo, y a los consejos, enseñanzas, infinita paciencia y sobre todo a la gran confianza que has depositado en este individuo. Siempre serás un ejemplo para mí.

Al extraordinario grupo de investigación de clínica Nascere, Ariane, Ana Pau, muchas gracias por su guía y aportes en la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Viridiana García Ruiz, gracias a tu insistencia en el avance de este proyecto pude finalmente dar el paso final para cerrar este ciclo. Este trabajo también es tuyo Vi ri.

Al Dr. Fabián Arechavaleta, por su inconmensurable ayuda en la realización de este trabajo, me cuesta mucho expresar la gratitud que tengo con usted por su paciencia y ayuda. Su enorme compromiso con la investigación y con los estudiantes bajo su tutoría, me han inspirado un profundo respeto y admiración. Agradezco a Dios por haber hallado un aliado de su calibre. Gracias por todo.

Índice

Abreviaturas	
Resumen	1
Abstract.....	3
Introducción.....	4
Infertilidad Masculina.....	4
Apoptosis.....	7
Externalización de Fosfatidilserina.....	8
Apoptosis y la fosfatidilserina en el espermatozoide.....	8
Objetivos.....	12
Objetivo General	12
Objetivos Particulares	12
Hipótesis	13
Antecedentes	14
Metodología.....	18
Parámetros iniciales de la muestra seminal	19
Técnica swim up.....	20
Estimulación Ovárica	21
Selección de óvulos para la ICSI.....	21
Desarrollo embrionario.....	22
Resultados	24
Tasa de fertilización.....	25
Fragmentación embrionaria en día 2 y día 3.....	27
Obtención de Blastocisto.....	29
Discusión.....	31
Conclusiones	35
Referencias Bibliográficas.....	36
Referencias.....	36
Bibliografía.....	38
Apéndice	40

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
DGC	Density Gradient Centrifugation (Centrifugación por Gradiente de Densidad)
FIV	Fertilización In Vitro
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormona Foliculo Estimulante)
GnRH	Gonadotropine Release Hormone (Hormona Libedadora de Gonadotropinas)
HTF-M	Human Tubal Fluid Modified (Líquido Humano Tubárico Modificado)
IAH	Inseminación Artificial Homóloga
ICSI	Intra Cytoplasmic Sperm Injection (Inyección Intracitoplasmática de Espematozoide)
IM	Índice de Movilidad
IMSI	Intracytoplasmatic Morphologically selected Sperm Injection (Inyección Intracitoplasmática de Espematozoide seleccionado Morfológicamente)
LH	Luteinizing Hormone (Hormona Luteinizante)
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting (Clasificación de células activadas magneticamente)
MT	Movilidad Total
PE	Phosphatidylethanolamine (fosfatidiletanolamina)
PS	Phosphatidil Serine (FosfatidilSerina)
PICSI	Physiological Intracytoplasmatic Sperm Injection (Inyección Fisiológica Intracitoplasmática de Espematozoide).
Rpm	Revoluciones por minuto
SSS	Suero sintético sustituible
SU	Swim up (Nado arriba)
TRA	Técnicas de Reproducción Asistida

Resumen

Introducción: El factor masculino en la infertilidad está presente en el 30% de casos como factor único y hasta 50% con factor femenino asociado. Los resultados de ciclos de FIV en clínicas de infertilidad aún son insatisfactorios. Una de las posibles causas es la fecundación de ovocitos mediante ICSI con espermatozoides con procesos apoptóticos activos. Uno de los primeros marcadores de tal proceso es la externalización de la FS, con ayuda de la Anexina V conjugada con esferas de hierro llamada "microbeads", se marcan dichos gametos para que a su paso por una columna magnética, puedan ser retenidos, dejando paso a los espermatozoides sin procesos apoptóticos activos.

Objetivo: Evaluar si la combinación de swim-up (SU) y la separación celular por columnas magnéticas conjugadas con Anexina V (MACS) para la obtención de espermatozoides a partir de muestras de semen mejora el porcentaje de fertilización ovocitaria, el porcentaje de obtención de blastocisto y la calidad embrionaria en los primeros días de desarrollo.

Materiales y Métodos: El presente trabajo fue un estudio piloto, de carácter prospectivo y comparativo. Se incluyeron 19 parejas referenciadas para tratamiento de reproducción asistida de alta complejidad y cuyo diagnóstico incluía algún factor masculino asociado o infertilidad inexplicable. La muestra seminal de cada pareja fue procesada mediante SU y posteriormente una fracción era tomada para el procesamiento con el MACS. Los ovocitos de cada paciente fueron divididos en 2 grupos, uno de ellos se fertilizó mediante ICSI con espermatozoides provenientes del SU, mientras que para el otro grupo se utilizaron muestras proveniente de SU-MACS. Todos los ovocitos se observaron a las 16-18, 42, 66 y 115 h postinyección para verificar fertilización, desarrollo embrionario y obtención de blastocisto. Se obtuvieron un total de 250 ovocitos, 123 que fueron microinyectados con espermatozoides obtenidos mediante SU y 127 que se microinyectaron con espermatozoides recuperados mediante SU-MACS. Se comparó la tasa de fertilización, fragmentación embrionaria en día 2 y 3, y obtención de blastocisto con respecto a la técnica de procesamiento de las muestras espermáticas (SU ó SU-MACS). Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS.

Resultados: Los resultados obtenidos no mostraron significancia estadística en ninguno de los parámetros analizados. No obstante se observó una tendencia al aumento en la tasa de

fertilización, disminución de fragmentación embrionaria en los días 2 y 3, así como una mayor obtención de blastocisto usando espermatozoides procesados mediante SU-MACS. Dichas tendencias apuntan que la técnica SU-MACS tiene un impacto mayor en hombres a partir de 38 años de edad.

Conclusiones: Aunque el uso de SU-MACS parece presentar mejoras en los parámetros estudiados, hace falta incrementar el número de pacientes para confirmar las observaciones. El SU-MACS parece tener su impacto más fuerte en hombres a partir de 38 años de edad.

Palabras Clave: Espermatozoide, Apoptosis, Magnetic Activated Cell Sorting (MACS), Inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), Anexina V, Fosfatidilserina, Blastocisto, Fragmentación embrionaria, Fertilización.

Abstract

Introduction: The male factor in infertility is present in 30% of cases and up to 50% with an associated female factor. The results of IVF cycles in infertility clinics are still unsatisfactory. One of the possible causes is the fertilization by ICSI of oocytes with spermatozoa with apoptotic process. One of the first markers of this process is the externalization of PS, with the help of Annexin V conjugated with iron spheres called "microbeads", these gametes are marked so that as they pass through a magnetic column, they can be retained, leaving passage to spermatozoa without active apoptotic processes.

Objective: To demonstrate whether combination of two seminal preparations such as swim up (SU) and the magnetic separation by annexin V columns (MACS) improves the percentage of oocyte fertilization, the percentage of blastocyst obtaining, and the embryonic quality in the first days of development.

Materials and Methods: This was a pilot, prospective and comparative study. It included 19 patients referenced to in vitro fertilization whose diagnosis includes at least masculine factor or unexplained infertility. Each semen sample was processed by SU, and lately a fraction was taken for MACS. The patient's oocytes were divided in two groups, one of them was fertilized with SU sperm and the other with SU-MACS sperm. All the oocytes were examined 16-18, 42, 66 and 115 hrs post injection to verify fertilization, embryo development and blastocyst obtaining. Data were analyzed with the SPSS program.

Results: We did not find statistically significant differences for any parameter evaluated. Nevertheless, there is a trend to improve the fertilization rate, decrease embryo fragmentation rate on days 2 and 3, and improve blastocyst obtaining rate using sperm treated with SU-MACS.

Conclusions: Although using SU-MACS seems to improve the analyzed parameters, it is necessary to increase the number of patients to confirm these observations. The SU- MACS seems to have a higher impact for male patients of over 38 years old.

Keywords: Sperm, Apoptosis, Magnetic Activated Cell Sorting (MACS), Intracytoplasmic sperm Injection (ICSI), Annexin V, Phosphatidylserine, Blastocyst, Embryo Fragmentation, Fertilization.

Introducción

La infertilidad se define como la incapacidad de generar un embarazo después de tener relaciones sexuales no protegidas por un año. El factor masculino está involucrado en el defecto reproductivo, en el 30% de casos como factor único y hasta 50% con factor femenino asociado. Existen diversas causas que pueden generar infertilidad masculina entre ellas se encuentran, déficit hormonal, causas físicas, enfermedades de transmisión sexual, factores ambientales, estilo de vida o problemas genéticos (Babakhanzadeh et al., 2020).

Infertilidad Masculina

Para comprender mejor la etiología de la infertilidad masculina a continuación se describen los componentes y sistemas que rigen su funcionamiento. Los órganos reproductivos masculinos se clasifican en órganos primarios y secundarios. Los órganos primarios comprenden las gónadas las cuales son las responsables de la producción de gametos y algunas hormonas, mientras que los órganos secundarios incluyen ductos y glándulas. El eje hormonal reproductivo masculino consiste en tres partes principales: hipotálamo, hipófisis y glándulas testiculares. El objetivo de dicho eje es proveer las hormonas en la cantidad adecuada para el correcto funcionamiento y desarrollo sexual del varón. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que ejerce su función sobre la hipófisis, la cual a su vez libera la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), hormonas que actúan sobre los testículos. La FSH es esencial porque se une a las células de Sertoli para estimular la producción de líquido testicular y las síntesis de proteínas receptoras de andrógenos intracelulares, mientras que la LH se une a receptores de las células de Leydig para estimular la producción de testosterona, la cual a su vez se une a las células de Sertoli para promover la espermatogénesis. Por lo tanto, alteraciones en el eje hormonal conllevan a un mal funcionamiento del sistema reproductivo y por tanto infertilidad (Edwards R., et.al., 2003).

Los problemas físicos pueden alterar la producción de espermatozoides o bloquear vías eyaculatorias. El ensanchamiento de vasos sanguíneos, padecimiento conocido como varicocele es uno de los problemas más comunes de infertilidad masculina afectando al 40% de los hombres. La torsión testicular dentro del saco testicular puede causar daño debido a la presión sobre los vasos y comprometer la circulación sanguínea en el área, no es del todo concluyente el mecanismo

fisiopatológico por el cual genera problemas de fertilidad pero se ha sugerido que altera la producción de espermatozoides al parecer por cambios de temperatura y reflujo venoso, el cual lleva metabolitos renales y adrenales hacia la vena espermática alterando la fisiología testicular y por consiguiente la producción de esperma (Briseño L., et.al. 2008, Corral J. et.al., 2012),.

Por otra parte, hombres expuestos a sustancias peligrosas en sus lugares de trabajo tales como solventes, insecticidas, adhesivos, silicones o radiación pueden cursar con infertilidad. Asimismo, las ocupaciones que requieran periodos prolongados sentados o expuestos a altas temperaturas tienen efectos negativos en la fertilidad. Existe evidencia que el uso de drogas como cocaína y canabinoides, así como la ingesta de grasas saturadas reducen significativamente la concentración espermática, se cree que la relación entre infertilidad y obesidad reside en alteraciones epigenéticas en el espermatozoide (Hanson B., 2020).

Las infecciones en el sistema reproductivo masculino pueden afectar a varias partes del mismo como uretra, próstata, testículos o epidídimo (Remohí J. et. al. 2008). Se han descrito varios mecanismos patogénicos que producirían infertilidad en el hombre, tales como:

- ✓ Efectos directos de los microorganismos sobre los espermatozoides.
- ✓ Alteración en las vesículas seminales.
- ✓ Disfunción prostática.
- ✓ Inducción de fagocitosis espermática.
- ✓ Hiperproducción de especies reactivas de oxígeno.
- ✓ Estimulación de la formación de anticuerpos espermáticos, la cual dificulta la movilidad de los espermatozoides, e inhibe las interacciones entre espermatozoide y zona pelúcida impidiendo que los procesos de fertilización se lleven a cabo.

En las últimas dos décadas, las técnicas de reproducción asistida han llegado a ser el tratamiento de elección en muchos casos de infertilidad; y a pesar de que se han desarrollado múltiples técnicas para el mejoramiento de la población espermática (SU, DGC), así como métodos que buscan elegir un solo espermatozoide de alta calidad para obtener embriones sanos (PICSI, IMSI), las tasas de éxito en dichos tratamientos siguen siendo insatisfactorias.

La influencia del espermatozoide en el desarrollo embrionario temprano ha sido tema de múltiples investigaciones. Actualmente, es sabido que el material genético del espermatozoide influye en la formación de tejido extraembrionario como lo es la placenta, y más allá, se ha analizado su impacto en las características de los recién nacidos derivados de TRA, observándose que al mejorar la calidad espermática, se tiende a tener mayor peso al nacer (Barroso et al., 2018). Varios

factores que no se pueden analizar en el estudio seminal básico, tienen influencia en la calidad embrionaria en los primeros días de desarrollo. Por ello, para entender mejor los procesos involucrados en la fisiología del espermatozoide, se han investigado los factores en el gameto masculino, que pueden afectar el desarrollo embrionario temprano, especialmente a nivel celular, tales como la fragmentación embrionaria, componentes que participan en el empaquetamiento de la cromatina, actividad apoptótica y, modificaciones epigenéticas (Nanassy et.al., 2008, Simon et al., 2014, Middelkamp et. al.,2020)

Durante la espermatogénesis, la adecuada sustitución de histonas por protaminas P1 y P2 es un proceso que favorece el empaquetamiento del material genético del espermatozoide para posteriormente ser entregado al ovocito. La proporción de P1 y P2 es aproximadamente la misma, cuando esta proporción está alterada, el desarrollo embrionario se ve comprometido, dicha desproporción es vista en pacientes infértiles con fragmentaciones espermáticas altas (Nasr-Esfahani et.al., 2005). El empaquetamiento defectuoso de cromatina espermática puede dejar el ADN susceptible a roturas en la secuencia de una o ambas cadenas. Dicha fragmentación puede darse por la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS), procesos apoptóticos durante la espermatogénesis, quimioterapia, radioterapia o agentes tóxicos ambientales, y son parámetros asociados a pacientes con problemas de fertilidad (Hamilton 2020). Las anomalías en la condensación de cromatina han sido también correlacionadas con aneuploidías cromosómicas en el embrión, y dichas anomalías tienen una fuerte contribución en el escaso éxito de los ciclos de fertilización *in vitro*. Asimismo, se ha asociado una alta fragmentación espermática con un pobre desarrollo embrionario (Quintero et al., 2015), así como con bajas tasas de embarazo clínico (Benchaib et al., 2003; Wdowiak et al., 2016) y altas tasas de abortos espontáneos (Haddock et. al., 2020).

Existen estudios que proponen una posible conexión entre el daño al cromosoma Y con el diagnóstico del paciente infértil. El cromosoma Y tiene tres regiones AZRa, AZRb y AZRc, y la pérdida parcial, total o combinada de estas regiones está asociada con pacientes con diagnóstico de azoospermia y criptoospermia (Aitken 2020). No obstante, al analizar los resultados de ciclos de FIV no existe consenso con respecto a la intervención de microdeleciones en el cromosoma masculino y su impacto en el éxito de las TRA (Rabinowitz et al., 2021).

Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular que se lleva a cabo evitando procesos inflamatorios: y puede ser activada por diversos estímulos que generan estrés en la célula, como daño al ADN, señales del medio ambiente, radiación, hipoxia, hipertermia, presencia de especies reactivas de oxígeno, etc. La apoptosis se puede desencadenar por dos vías principales: la vía intrínseca y la extrínseca, ambas desembocan en la activación de las caspasas, que son un grupo de cisteína proteasas que se expresan como zimógenos en casi todas las células.

En lo que respecta a la vía intrínseca, esta es activada por estrés y otras señales que provocan la salida de citocromo C desde la mitocondria o la alteración de la membrana de la misma, esta vía está estrechamente regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2. Hay dos grupos principales, las proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-X_s, Bid, Bik, Bim, Hrk) y las antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1). Otros factores apoptóticos que se liberan desde el espacio intermembranoso mitocondrial hacia el citoplasma incluyen al factor inductor de apoptosis (AIF), al segundo activador de caspasa derivado de mitocondria (Smac), a la proteína de unión al IAP (inhibidor de proteínas de apoptosis) directo con bajo pH (DIABLO) y la proteína A de requerimiento de alta temperatura /Omi (HtrA2). No es la cantidad absoluta, sino el balance de proteínas pro y anti-apoptóticas lo que determina si se va a iniciar o no la apoptosis. La liberación citoplasmática del citocromo C activa la caspasa 3 por medio de la formación del complejo conocido como apoptosoma que está conformado de citocromo C, Apaf-1 y caspasa 9. Por otro lado, el Smac/DIABLO o la Omi/HtrA2, promueven la activación de la caspasa, uniéndose a los IAPs que posteriormente lleva a la disrupción en la interacción de los IAPs con la caspasa 3 o 9 (Samano G. et. al., 2020).

La vía extrínseca se da cuando los polipéptidos de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF α y β), el ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) y el ligando Fas, se unen y activan sus receptores (TNFR, TRAILR, Apo1, Fas ó CD9). Una vez que ocurre la unión del ligando y su receptor, se induce la trimerización de éste último, seguida del reclutamiento del oligómero de la proteína adaptadora FADD (proteína que se asocia a Fas) o de TRADD (proteína que se asocia al receptor TNF), formando una estructura llamada complejo de señalización inductor de muerte (DISC) (Samano G. et. al., 2020; Daniel R. et.al., 2012).

Si bien los mecanismos apoptóticos ayudan a mantener la población espermática controlada, existe evidencia de que en muestras seminales normales existen espermatozoides que presentan ADN fragmentado y ligando Fas, cuya presencia indica una apoptosis incompleta. Cuando el ligando Fas y su receptor se unen, estimulan activación de caspasas 1 y 9 en la membrana interna de la mitocondria y éstas a su vez activan a la caspasa efectora 3, la cual posteriormente, promueve la actividad de una DNAsa que produce fragmentación de ADN y apoptosis (Zahra B., 2020).

Externalización de Fosfatidilserina

Los fosfolípidos se distribuyen asimétricamente entre las caras externa e interna de la membrana plasmática, y para que éstas moléculas puedan cambiar de lugar (proceso denominado "flip-flop") es necesario la acción de proteínas denominadas translocasas, de las cuales existen tres tipos: flipasas, flopasas y escramblasas.

Las flipasas se encargan de mantener a los lípidos en la cara interna y, al contrario, las flopasas en la cara externa. Por último, las escramblasas participan en el movimiento en ambas direcciones. En PS esta capacidad de traslocarse se mantiene debido a la acción de una familia de ATPasas conocida como P4-ATPasas, en la que se ha reportado ATP11A y ATP11C que funcionan como flipasas, traslocando activamente la PS y la PE hacia la cara citosólica de la célula. En un evento apoptótico, las células exponen la PS en cuestión de horas, y esto se debe a que ATP11A y ATP11C son escindidos e inactivados por la acción de las caspasa 3 durante el proceso de muerte celular, mientras que su actividad de ATPasa es inhibida por una alta en la concentración de Ca^{2+} (Samano-Barbosa et.al., 2020).

Apoptosis y la fosfatidilserina en el espermatozoide

El proceso apoptótico en células sexuales no ha sido estudiado profundamente, sin embargo, se ha reportado que, en el proceso de espermatogénesis, la apoptosis juega un papel clave durante la producción y el control eficiente de las células de Sertoli, fagocitando a las células que presentan marcaje de PS en la cara externa de la membrana celular, considerándose que la PS tiene una función de eliminación celular, además, la apoptosis en células germinales es esencial en el mantenimiento de la proporción entre células germinales y células de Sertoli, y la eliminación de células germinales anormales, especialmente en la madurez (Asadi A. et.al. 2021).

Varias moléculas están implicadas en los cambios membranales que sufre el espermatozoide en las diversas etapas para lograr la fecundación, y una de las moléculas que desempeña un papel central en estos eventos es la PS. En los espermatozoides, al igual que en células somáticas, la PS se encuentra en la cara interna de la membrana espermática. Si bien se ha dicho que la PS se externaliza en espermatozoides como indicador apoptótico, también está presente después de la capacitación y reacción acrosomal, como parte del proceso fisiológico en el cual el espermatozoide se prepara para fusionarse con el ovocito. Se mostró que la PS expuesta en la región de la cabeza de los espermatozoides viables y móviles, y un aumento progresivo durante su tránsito por el epidídimo. Se realizaron experimentos donde se interrumpió la acción de receptores de reconocimiento de PS (BAI1, CD36, Tim-4 y Mer-TK) en el ovocito, que fueron marcados basándose en los receptores que muestran fagocitos para identificar a PS. Posteriormente se realizaron pruebas de fecundación y se demostró que dichos receptores contribuyen a la fecundación, debido a que al ser bloqueados, la tasa de fertilización disminuyó. En conclusión, este estudio sugiere que la externalización de PS se lleva a cabo de manera progresiva en el epidídimo, sin embargo, no como una señal de eliminación celular, si no como una modificación de la membrana requerida para tener éxito en la fecundación.

Como ya se mencionó, uno de los marcadores tempranos de la apoptosis espermática es la externalización de la PS (Taylor S.L., 2004). Una de las técnicas desarrollada en los últimos años para mejorar el potencial de fertilización de las poblaciones espermáticas es el MACS, que consiste en el aislamiento de espermatozoides apoptóticos gracias a la unión de alta afinidad de la PS con la anexina V, la cual está acoplada a esferas de 50 nm de diámetro llamadas "microbeads". El complejo generado es retenido en la columna gracias a la acción de un campo magnético dejando así pasar a los espermatozoides no apoptóticos como se muestra en la figura 1 (Tejeiro et al., 2017).

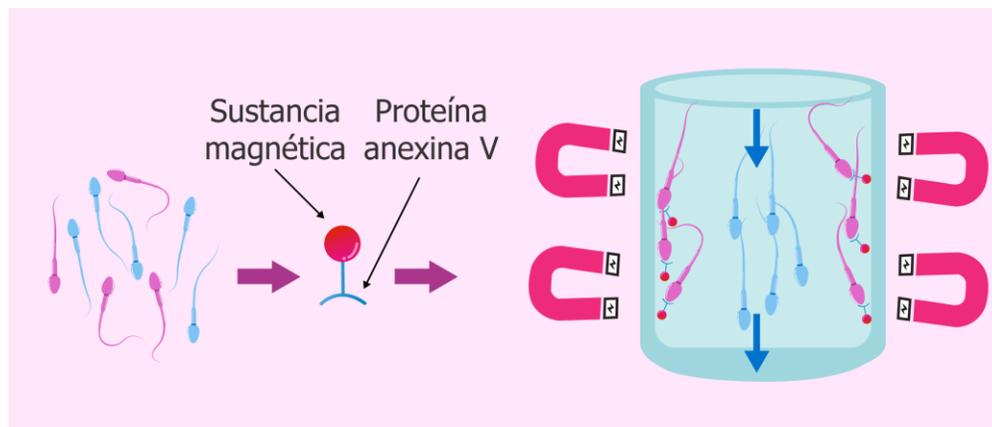


Figura 1. Aislamiento de espermatozoides apoptóticos al pasar por la columna magnética activada acoplada a Anexina V.

Una de las posibles explicaciones para el pobre desempeño embrionario en el laboratorio de reproducción asistida, es la inclusión de espermatozoides apoptóticos o espermatozoides con DNA fragmentado que pueden presentar morfología y movilidad normales durante el FIV o el ICSI.

Capacitación Espermática

La capacitación es un proceso espermático de cambios fisiológicos y bioquímicos durante su paso a través del tracto reproductor femenino para que lo habiliten para fecundar. Las modificaciones incluyen remoción de factores descapacitantes como el colesterol, aumento de la fluidez y permeabilidad de membrana, cambios en la fosforilación de proteínas, hiperpolarización de la membrana plasmática aumento de la concentraciones intracelulares de calcio y cambios en el patrón de movilidad.

Es sabido que el colesterol en el fluido seminal puede actuar como inhibidor de la capacitación espermática, de hecho, la albúmina es un buen captador de colesterol y se encuentra en abundancia en el oviducto, por lo que durante el paso del espermatozoide a través de éste, se elimina de la membrana. La disminución del colesterol explica el cambio en la fluidez de la membrana y la distribución de glicoproteínas en la superficie del esperma. Estos cambios resultan en la alteración del potencial de membrana y aumento en la permeabilidad de iones Ca^{2+} y HCO_3^- . Este flujo inicia una cascada de eventos de señalización que incluyen: activación de la adenilato ciclasa y por consiguiente aumento de AMPc, estimulación de Proteína cinasa A además de otras cinasas.

Durante la capacitación espermática, se ha observado que varias proteínas se fosforilan en los residuos de tirosina, tanto por acción de algunas citocinas y factores de crecimiento presente tanto en fluido seminal como en secreciones del tracto femenino, como por la acción de las quinasas antes mencionadas. Aunque los mecanismos aún se desconocen, se ha propuesto que las fosforilaciones juegan un papel posterior en la regulación y función de canales de K^+ y Ca^{2+} .

Una vez capacitados los espermatozoides, expresan el patrón de hiperactivación, la cual contempla cambios en la movilidad espermática, caracterizado por aumento en el movimiento y flexión del flagelo, ampliación en el desplazamiento lateral de la cabeza y trayectoria curva. Se genera la fuerza para penetrar la capa de células de la granulosa y la inserción inicial del espermatozoide en el ovocito. Para inducir la hiperactivación se requiere de la entrada de Ca^{2+} extracelular, elevación intracelular de AMPc y disminución de pH intracelular, el Ca^{2+} se une a proteínas fijadoras en el brazo externo de la dineína (en la parte interna del flagelo) induciendo movimiento asimétrico.

En el laboratorio de reproducción asistida, las llamadas técnicas de capacitación espermática son procedimientos que intentan emular in vitro los cambios en el espermatozoide durante la capacitación habilitándolo para la fertilización del ovocito, para ello, se requieren medios de cultivo que contengan una fuente de energía como piruvato, lactato, y glucosa, fuente proteica como albúmina, y además HCO_3^- y Ca^{2+} . Existen diversas técnicas de capacitación que se valen de características propias de la muestra (movilidad, integridad de la cabeza) para obtener células con un potencial de fertilización mayor. Entre ellas se cuentan el swim up y la separación por gradientes de densidad, ambas técnicas de bajo costo, de fácil realización y con un porcentaje de recuperación alto, por lo cual son las más ampliamente utilizadas. El swim up depende de la movilidad espermática que le permite a la célula migrar fuera del semen o un pellet hacia un medio definido. Puede obtenerse hasta 90% de movilidad con SU, y se ha sugerido que es el método de capacitación que tiene tendencia a mejorar tasas de embarazo (Carballo-Mondragón et al., 2011).

Por lo anterior, la obtención de una población espermática de buena calidad, se ha convertido en una prioridad en el laboratorio de reproducción asistida, dado que se ha demostrado su importancia en el desarrollo temprano inmediato a la fertilización, y está asociada con un retraso en la formación de pronúcleos. Está bien establecido que las anomalías en el ADN paterno impactan negativamente la calidad embrionaria (Virro 2004, Simon 2010).

Objetivos

Objetivo General

- Comparar si el uso conjunto de SU-MACS mejora la tasa de fertilización mediante ICSI así como parámetros embrionarios en los primeros días de desarrollo.

Objetivos Particulares

- Obtener y comparar la tasa de fertilización de óvulos microinyectados con espermatozoides procesado mediante SU vs espermatozoides procesado mediante SU-MACS.
- Comparar el desarrollo en día 2 y 3 de embriones provenientes de óvulos fertilizados con espermatozoides procesado mediante SU vs espermatozoides procesado mediante SU-MACS.
- Comparar la tasa de obtención de blastocistos provenientes de óvulos fertilizados con espermatozoides procesado mediante SU vs espermatozoides procesado mediante SU-MACS.

Hipótesis

La tasa de fertilización, los parámetros embrionarios en día 2 y 3, así como la tasa de obtención de blastocisto, mejorará microinyectando ovocitos con espermatozoides procesados con SU-MACS.

Antecedentes

Existen múltiples trabajos realizados alrededor de la técnica del MACS (Tejeiro et al., 2017). En un inicio muchos de éstos han probado su impacto sobre parámetros comúnmente medidos en laboratorio de reproducción asistida tales como morfología, movilidad, concentración, y porcentaje de fragmentación espermática.

Dado que se estableció que la criopreservación afecta los parámetros antes mencionados, se aplicó la técnica a poblaciones espermáticas que habían sido vitrificadas para ciclos de FIV, y se encontró que la fragmentación espermática disminuyó y la movilidad aumentó de 64.5% a 76% después del MACS (Said et. al., 2005).

También se ha observado el impacto del MACS en conjunto con SU y DGC midiendo la cantidad de proteínas presentes en la membrana del espermatozoide como la proteína de reconocimiento y fusión espermatozoide-ovocito (Izumo 1) y la Proteína de activación ovocitaria (PLC ζ), que tienen un papel importante en la fecundación, así como parámetros morfológicos y de movilidad. Se encontró que en la fracción no retenida en la columna (libre de apoptosis) hubo disminución en la movilidad de espermatozoides rápidos y progresivos tanto en muestras con normozoospermia como con oligozoospermia, y en el resto de parámetros no se hallaron diferencias significativas (Cakar et al., 2016).

Parámetro	Movilidad (%)			% Fragmentación (TUNEL)		
	Fresco	SU-MACS	DGC-MACS	Fresco	SU-MACS	DGC-MACS
Tipo de muestra						
Normozoospermia	19.6	4.1	2.5	21.4	10.3	17.7
Oligozoospermia	2.4	0.02	1.5	12	9.4	8.4

Se ha sugerido que el orden en que se realizan las técnicas de capacitación espermática y su conjunción con MACS tienen influencia en la calidad de la población espermática final. El porcentaje de fragmentación de la cromatina espermática (Muestra fresca=24% vs MACS-DGC=4%) y la movilidad progresiva de (Muestra fresca=39% vs MACS-DGC=68%) mejoran si se

utiliza de inicio el MACS en la muestra seminal cruda, seguido de la separación por gradientes (Bertelli et. al., 2017). Se sospecha que la realización de técnicas de capacitación espermática altera la membrana celular, induciendo la externalización de fosfolípidos como la fosfatidilserina, reduciendo la eficiencia posterior del MACS ya que dicho proceso no se da como consecuencia del inicio de la apoptosis en el espermatozoide, por lo que en la columna son retenidos espermatozoides apoptóticos como no apoptóticos. De manera análoga a lo mencionado anteriormente, se ha documentado el efecto del MACS y la técnica de capacitación SU, sobre la población espermática final, implementando las técnicas individualmente y en conjunto, hallándose que haciendo SU seguido de MACS se reduce más eficientemente la fragmentación de (muestra fresca=30% vs Muestra SU-MACS=12%), y aumenta el índice de movilidad (Muestra fresca=50% vs SU-MACS=80%) (Jeseta et al., 2018). Bucar y colaboradores (2015), combinaron ambas técnicas de capacitación usadas en laboratorios de FIV (Swim up y gradientes de densidad) con el MACS, y determinaron que el mejor protocolo que se puede aplicar es MACS-DGC-SU, lo cual redujo en mayor porcentaje la fragmentación espermática (83.3%), con respecto de los demás grupos de estudio, en especial en muestras con baja movilidad y vitalidad (Bucar et al., 2015).

Se han desarrollado estudios donde se analizan marcadores apoptóticos tales como externalización de fosfatidilserina, alteración del potencial de membrana mitocondrial y fragmentación de DNA e induciendo la reacción acrosómica. Se encontró que tras la aplicación del MACS, en pacientes diagnosticados con infertilidad inexplicable y con dos inseminaciones artificiales homólogas fallidas, los marcadores apoptóticos como la alteración de potencial de membrana mitocondrial disminuyó (DGC=28.3% vs DGC-MACS=19.2%), y la fragmentación embrionaria disminuyó (DGC=13.5% vs DGC-MACS=9.9%) mientras que la reacción acrosómica fue incrementada en aproximadamente 10% (Tsung-Hsien et al., 2010).

Además de analizar parámetros seminales, se ha analizado tasa de fertilización, tasa de división, calidad embrionaria y, embarazo clínico en ovocitos propios y donados. Los resultados sugieren que el uso de MACS pueden aumentar el embarazo clínico, aunque los resultados no son concluyentes y se señala que se requiere una muestra de estudio más amplia para confirmar estos resultados (Merino et al., 2019).

Al analizar el impacto del MACS en calidad embrionaria se ha identificado que la tasa de embriones de buena calidad (DGC=20% vs MACS-DGC= 35.85%) junto con la de embarazo clínico (DGC=24.24% vs MACS-DGC= 54.54%) y de implantación (DGC=15.7% vs MACS-DGC= 36.3%) se incrementa con el uso de MACS (Ziarati et al.,2018). En contraste, otras metodologías que

emplean Swim up como técnica de capacitación y no gradientes de densidad no encuentran diferencias significativas en la tasa de fertilización (MACS=75.3 %, control=72.1%), implantación (MACS=42.2%, control=40.1%), embarazo (MACS=64.2%, control=71.1%) y recién nacido vivo (MACS=48.4%, control=56.4%) (Romany et al., 2014). En un estudio similar utilizando únicamente DGC y DGC-MACS donde observaron parámetros como fertilización, segmentación, calidad embrionaria, embarazo dínico y recién nacido vivo, concluyeron que la tasa de fertilización fue más alta, y la calidad embrionaria mejoró obteniendo más embriones de alta calidad (6-8 blastómeras simétricas, sin fragmentación embrionaria, apéndice 1, figura 4) en día 3 de desarrollo tras el uso del MACS, pero, no se encontraron diferencias significativas en embarazo dínico (DGC=35.11% vs DGC-MACS=43.24%) y nacimiento (DGC=27.03% vs DGC-MACS=40.54%) (Sheikhi et al., 2014).

En cuanto al estudio de MACS y su impacto en etapas posteriores a la transferencia embrionaria, encontramos estudios donde gracias a la aplicación de las columnas de anexina V en pacientes con fragmentaciones espermáticas mayores al 20%, se observó una disminución estadísticamente significativa en la tasa de aborto espontáneo, y aumento en la tasa de recién nacido vivo (Pacheco et al., 2020). Además de lo anterior, se han reportado aumentos en las tasas de implantación (SU=42.1% vs SU-MACS=57.1%), embarazo clínico (SU=60% vs SU-MACS=80%) y recién nacido vivo (SU=55% vs SU-MACS=80%) aplicando SU-MACS (Barroso et al., 2018).

El MACS no sólo se ha aplicado a técnicas de alta complejidad como el ICSI, también se ha utilizado en tratamientos de baja complejidad como la inseminación artificial, donde la tasa de embarazo y recién nacido vivo son ligeramente mayores en el grupo donde no se utilizó MACS con respecto al grupo de estudio donde sí se empleó, conduciendo que cuando no existe una indicación clínica concreta, no mejora los resultados de embarazo (DGC-MACS=16.2% vs DGC=17.7%) ni de recién nacido vivo (DGC-MACS=12.9% vs DGC=15.3%) (Ballester et al., 2016).

En varios trabajos aplicando MACS, se ha encontrado que la morfología aumenta, la fragmentación espermática de DNA disminuye, y la movilidad espermática se incrementa, no obstante, no hay muchos estudios que brinden información respecto al impacto del MACS en el desarrollo embrionario temprano, incluyendo la calidad embrionaria, tasa de fertilización, efecto sobre recién nacido vivo, etc. Por tanto, muchos de los estudios concluyen con la necesidad de seguir estudiando dichos parámetros y aumentar los tamaños de muestra, a fin de obtener resultados que respalden o descarten la anexión del MACS en las técnicas de reproducción asistida de uso común.

Es por ello que el presente estudio pretende ampliar el conocimiento sobre el impacto que tiene ésta técnica asociada al SU en el éxito del ICSI, y su devenir en una técnica de aplicación cotidiana en los laboratorios de reproducción asistida.

Metodología

Este estudio se realizó en la clínica Nascere, con la autorización del comité de ética y bajo la supervisión del director médico y el director de laboratorio de la misma institución. Previamente a la inclusión de cada pareja, se les solicitó su autorización en el enrolamiento del estudio mediante un consentimiento informado.

En el presente estudio se indujeron parejas cuyo diagnóstico previo a los procedimientos concernientes al estudio y sustentado con los análisis correspondientes indujera algún factor masculino como teratozoospermia, astenozoospermia u oligospermia, o bien, infertilidad inexplicable.

Diagnóstico	Descripción
Teratozoospermia	Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales debajo de límite de referencia inferior.
Astenozoospermia	Porcentaje de espermatozoides móviles progresivos debajo del límite de referencia inferior
Oligospermia	Número total de espermatozoides debajo del límite de referencia inferior
Infertilidad Inexplicable	Diagnóstico dado a parejas cuyos estudios de fertilidad respectivos estén dentro de los límites de referencia

El criterio de exclusión indujo parejas cuya muestra espermática presentara aglutinación 1 hora después de capacitarse.

La muestra espermática capacitada por swim up se dividió en dos grupos: Grupo 1, muestra espermática procesada con SU y grupo 2, muestra espermática procesada por SU-MACS. Con las muestras espermáticas obtenidas se realizó ICSI utilizando los ovocitos recuperados de la pareja mediante hiperestimulación ovárica, y para cada grupo se evaluó:

- a) Porcentaje de fertilización (observada 16 a 18 horas post inyección).
- b) Porcentaje de fragmentación embrionaria en los días 2 y 3 de desarrollo.
- c) Obtención de blastocistos en el día 5 del desarrollo (115 h post inyección).

Parámetros iniciales de la muestra seminal

Cada paciente recolectó una muestra de semen en un contenedor estéril después de 3 a 5 días de abstinencia sexual. Los parámetros iniciales considerados como normales se basaron en el Manual de la OMS, 5ta edición del 2010 y fueron los siguientes:

- ✓ Concentración (15 millones/mL)
- ✓ Movilidad (progresiva $\geq 32\%$, total del $\geq 40\%$)
- ✓ Morfología ($\geq 4\%$ de formas normales)
- ✓ Volumen (≥ 1.5 mL)
- ✓ Cuenta espermática total (>39 millones)

Después de la licuefacción (15-30 min) se colocaron 5 μ L de muestra seminal en una cámara de Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel), en la que se observó bajo un microscopio de luz la movilidad y concentración espermática. Para la evaluación de la morfología, una muestra seminal (5 μ L) se extendió en un portaobjetos y se dejó secar durante 5 minutos antes de prepararse con la tinción Diff-Quick (Baxter Dade Diagnostics, Dubingen, Switzerland). Se leyeron en promedio, 100 espermatozoides por extendido en microscopía de luz, con un objetivo de inmersión 100 X. La morfología se evaluó de acuerdo con los criterios de Kruger, dicho parámetro sólo se midió en la muestra en fresco. Los criterios de Kruger en el manual de la OMS, 5ta edición incluyen:

- ✓ La cabeza debe ser lisa de contorno regular y en general de forma oval. una región acrosomal que comprenda entre el 40%-70% del área de la cabeza. La región acrosomal no debe contener vacuolas grandes o mas de dos pequeñas.
- ✓ La pieza media debe ser delgada, regular y de la misma longitud de la cabeza. El eje de la pieza media debe estar alineado con la cabeza. Los residuos citoplasmáticos se consideran anormales en exceso, o cuando tiene mas de la tercera parte del tamaño de la cabeza del esperma.

- ✓ La cola debe presentar grosor uniforme en toda su longitud, debe ser mas delgado que la pieza media y de aproximadamente 45 μm de longitud. No debe estar enrollada sobre si misma.

Para clasificar la movilidad espermática se toman dos parámetros, conocidos como índice de movilidad y movilidad total, a continuación se describe en que consiste cada uno:

Tipo de Movilidad	Características
Movilidad Tipo A	Espermatozoides con movilidad recta y rápida
Movilidad Tipo B	Espermatozoides con movilidad disminuida, tanto recta como en "zig-zag"
Movilidad Tipo C	Espermatozoides que se mueven y no se desplazan
Movilidad Tipo D	Espermatozoides inmóviles
Índice de Movilidad	A+B
Movilidad Total	A+B+C

Técnica swim up

Después de la licuefacción (tiempo en el que el semen pasa de tener consistencia de gel a líquido) la muestra seminal se lavó con HTF-modificado (Irvine Scientific, Netherland) al 10% de suero sintético sustituible (SSS Irvine Scientific, Netherland) en proporción 1:1 durante 10 minutos a 1220 rpm. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y al sedimento celular se añadió 0.5 mL de HTF-M/SSS, se colocó en la incubadora a 37 °C durante 60 minutos. Al terminar la incubación se separó el sobrenadante y se colocó en un tubo. La muestra espermática que se obtuvo después del SU se dividió en dos fracciones, una de las cuales fue utilizada para el MACS.

Columnas de anexina V (MACS)

La fracción espermática utilizada para MACS fue procesada para obtener una concentración final de 10 millones/mL; obtenida la concentración indicada, se tomaron 10 μL y se colocaron en un tubo junto con 1 mL de buffer que viene en el kit. La mezcla se centrifugó 6 minutos a 1220 rpm, al terminar el ciclo, se retiró el sobrenadante y al sedimento resultante se le añadieron 200 μL de

microesferas de anexina-V conjugada (Miltenyi Biotec, GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. La suspensión de los espermatozoides con microesferas se cargó en la columna de separación previamente lavada con 1 mL de buffer y se recolectó en un tubo. Con 1 mL de buffer se realizó un segundo lavado a la columna y se recolectó en un segundo tubo. A ambos tubos se añadió 1 mL de HTF-M/SSS y se centrifugaron 8 minutos a 1220 rpm. Los sedimentos celulares obtenidos se resuspendieron en 0.5 mL de medio HTF-M con suero sintético sustituible y posteriormente se utilizaron para ICSI.

Estimulación Ovárica

Los ciclos de estimulación fueron dirigidos por el grupo médico de la clínica, mismos que determinaron qué ciclo de estimulación era más conveniente para cada paciente con base en estudios clínicos como perfiles hormonales, que incluyen determinación de estradiol, progesterona, hormona folículo estimulante, hormona luteinizante y hormona antimülleriana. También se considera la historia clínica de cada pareja, si tiene ciclos fallidos de baja complejidad (procedimientos donde el contacto entre gametos se da en el útero de la paciente como inseminación artificial o coito programado), si tiene ciclos fallidos de alta complejidad (procedimientos donde el contacto entre gametos se da fuera del útero de la paciente como ICSI y FIV) en otros centros, o resultados de ciclos previos en nuestra clínica.

De las 19 parejas, 16 fueron estimuladas con protocolo corto usando antagonista de la GnRH(cetrotide), mientras que sólo 3 fueron estimuladas con protocolo largo usando agonista de la GnRH(Gonapeptyl).

Todas las parejas asistieron a la clínica aproximadamente de 3 a 5 veces durante el ciclo para seguimiento folicular; mediante ultrasonido determinando el número y tamaño de los folículos, así como la toma de muestra sanguínea para determinación de estradiol. Entre los días 9 y 11 del ciclo, las 19 pacientes fueron disparadas (12 con Ovidrel y 7 con Gonapeptyl) para desencadenar la maduración folicular final, y 36 horas posteriores al disparo, se realizó la captura ovular.

Selección de óvulos para la ICSI

Los óvulos fueron obtenidos mediante punción folicular; con ayuda de un ultrasonido vía transvaginal se detectan los folículos y con ayuda de una aguja éstos son aspirados, el líquido folicular es guiado hacia tubos colectores. Estos tubos se pasan al laboratorio donde el líquido es

vertido en cajas de Petri para su observación en el microscopio; usando pipetas pasteur de 5" o 9" se aíslan los ovocitos del líquido folicular y se colocaron en medio de cultivo IVC-TWO.

Posteriormente se decumularon con hialuronidasa (In Vitro Care, USA) y con la pipeta Stripper (Cooper Surgical, Denmark) para caracterizar los ovocitos en sus diferentes estadios (metafase II, Metafase I y Profase I). Los óvulos en metafase II se microinyectaron con los espermatozoides seleccionados tres horas después de la denudación, mediante la ayuda de un microscopio invertido IX81 (Olympus Corporation Shibuya-ku, Tokyo, Japan). Los óvulos en metafase II obtenidos de cada paciente se dividieron de tal manera que aproximadamente el 50% de éstos se inyectaron con espermatozoides obtenidos por SU-MACS y el otro 50% con espermatozoides obtenidos con SU.

Desarrollo embrionario

Los óvulos fertilizados se evaluaron morfológicamente después de 16-18, 42, 66, 90, y 115 h posteriores a la fertilización. Los ovocitos fertilizados fueron cambiados de medio todos los días, se utilizó IVC-TWO (In Vitro Care, 20 mL, USA) 16-18, y 42 horas posteriores al ICSI y se utilizó IVC-THREE (In Vitro Care, 20 mL, USA) 66, 92 y 115 h posteriores al ICSI. Los cambios de medio se realizaron después de las observaciones morfológicas pertinentes.

Entre 18 y 20 horas posteriores al ICSI se revisó la fertilización considerándose como ovocitos fecundados normales aquellos que mostraron la presencia de los dos pronúcleos (Apéndice 1).

El porcentaje de fertilización se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ fertilización} = \frac{\# \text{ de ovocitos fertilizados normales}}{\# \text{ de ovocitos inyectados totales}} \times 100$$

Posteriormente, a las 42 y 66 horas después del ICSI se observaron y registraron las características morfológicas de los embriones. Se determinó el número de blastómeras presentes, blastómeras nucleadas, porcentaje de fragmentación y calidad embrionaria (Apéndice 1).

Después de 115 h, se evaluó si los embriones formaron blastocisto, tomando como parámetros morfológicos la presencia de masa celular y blastocele, además de expansión del embrión (Apéndice 1).

La obtención del porcentaje de obtención de blastocisto se muestra enseguida:

$$\% \text{Obtención de blastocisto} = \frac{\# \text{ de Blastocistos obtenidos en día 5}}{\# \text{ de ovocitos fecundados normalmente}} * 100$$

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa SPSS versión 21.0, en el cual se realizó la prueba de normalidad de datos por medio de la prueba Shapiro-Wilk, así como las pruebas de Mann-Whitney para comparaciones entre dos variables y Kruskal-Wallis seguida por una prueba de comparación múltiple entre todas las variables únicamente para el análisis de movilidad. Además, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para la relación entre variables. El error alfa ajustado menor de 5% ($p < 0.05$) a dos colas fue considerado como significativo. Los datos se presentan como mediana y rango intercuartil (RIQ).

Resultados

En el periodo de desarrollo del proyecto se indujeron 19 parejas que cumplieron los requisitos de inclusión. En la tabla 1 se muestra la edad promedio de las parejas; adicionalmente las características generales de las muestras seminales se muestran en la tabla 2. El análisis estadístico del índice de movilidad y movilidad total mostró una diferencia significativa entre la muestra en fresco y SU, así como SU y SU-MACS (tabla 2 y figura 2).

Tabla 1. Edad promedio de las parejas

Edad del Varón*	Edad de la Mujer*
37.63 ± 4.17	33.74 ± 4.28

* Valores expresado como media ± DE

Tabla 2. Características de las muestras seminales en cada etapa de procesamiento.*

Parámetro	Muestra en fresco	Muestra SU	Muestra SU-MACS	p [†]
Índice de movilidad	66 (40)	84 (26)	68 (30)	0.004
Movilidad total (%)	73 (44)	89 (25)	68 (40)	0.019
Morfología (%)**	4.84 ± 3.45	ND	ND	

* Valores expresado como mediana (RIQ). **La morfología únicamente se observó en la muestra en fresco y se expresa como media ± DE. [†]Calculada mediante la prueba de Kruskal-Wallis. ND, no determinada.

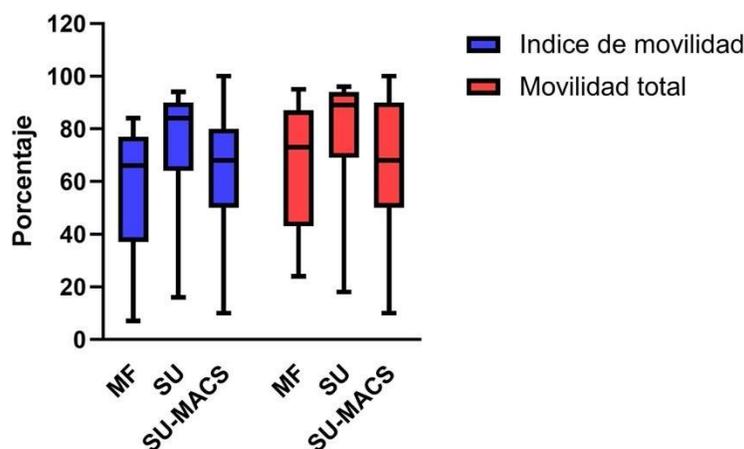


Figura 2. Movilidad espermática después de ser tratada para SU y SU-MACS. Cada barra representa la dispersión de los datos donde se muestra la mediana y los valores mínimo

y máximo. La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) en ambas variables.

Por otra parte, se obtuvieron 250 ovocitos, 123 de los cuales se destinaron al protocolo de SU, y 127 al protocolo SU-MACS.

Tabla 3. Número de ovocitos promedio utilizados para ICSI por pareja.*

Ovocitos por pareja con SU	Ovocitos por pareja con SU-MACS
6.47 ± 2.48	6.68 ± 3.07

* Valor expresado como media ± DE

Después de analizar las variables post-fertilización y de desarrollo temprano de los ovocitos microinyectados, se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables de respuesta estudiadas, como se muestra en tabla 4.

Tabla 4. Comparación de resultados entre protocolo SU y SU-MACS.*

Parámetro	Swim Up	Swim Up-MACS	p
Fertilización (%)	80.0 (26.4)	90.9 (28.6)	0.066
Fragmentación embrionaria en día 2 (%)	6.2 (6.3)	5.7 (4.1)	0.902
Fragmentación embrionaria en día 3 (%)	6.4 (4.8)	6.5 (6.4)	0.812
Blastocisto en día 5 (%)	33.3 (50.0)	20.0 (60.0)	0.429

* Los valores están expresados como mediana (RIQ). Los valores de P fueron calculados mediante la prueba de Mann-Whitney.

A pesar de que no se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos, se decidió realizar un análisis de correlación de Pearson con el objeto de determinar si existe relación entre los parámetros estudiados y edad de la pareja.

Tasa de fertilización

En las figuras 3 y 4 se muestra el análisis de correlación entre el porcentaje de fertilización y la edad del paciente o de la paciente, respectivamente. En lo que respecta a la edad de varón, se observa una correlación positiva débil al utilizar la técnica de SU-MACS ($r=0.212$), mientras que

para la técnica SU la correlación fue negativa débil ($r=-0.072$). En ambos casos, la relación entre las variables no fue significativa ($p=0.385$, $p=0.770$, respectivamente) (figura 3).

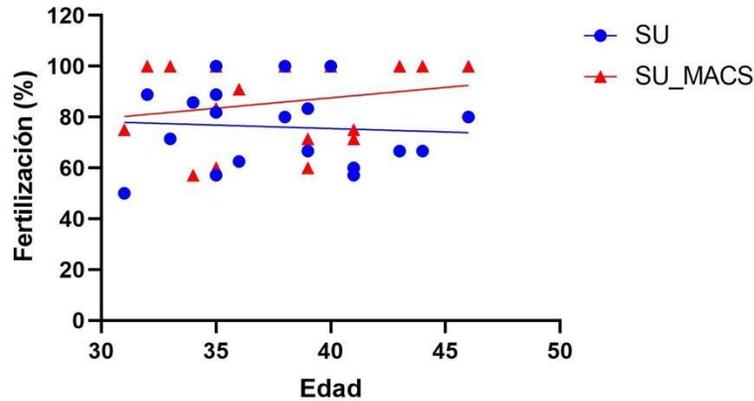


Figura 3. Correlación del porcentaje de fertilización con la edad del varón. La tendencia para la técnica de SU es negativa débil, mientras que para SU-MACS es positiva débil. En ambos casos no se observó una relación estadísticamente significativa ($p>0.05$).

Para la relación entre el porcentaje de fertilización y la edad de la mujer (figura 4), la correlación de Pearson fue positiva débil en ambos casos ($r=0.195$ para SU; $r=0.264$ para SU-MACS) pero con una relación no significativa ($p=0.424$ para SU; $p=0.275$ para SU-MACS)

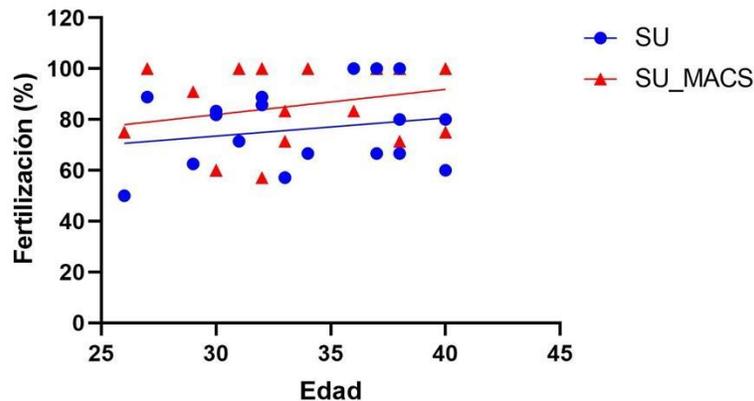


Figura 4. Correlación del porcentaje de fertilización con la edad de la mujer. La tendencia para ambas técnicas fue positiva débil. En ambos casos no se observó una relación estadísticamente significativa ($p>0.05$).

Finalmente, el porcentaje de fertilización en función de la morfología espermática tampoco mostró relación alguna ya que la correlación de Pearson para SU y SU-MACS fueron de 0.307 y 0.271, mientras que el valor de significancia fue de 0.201 y 0.261, respectivamente (figura 5).

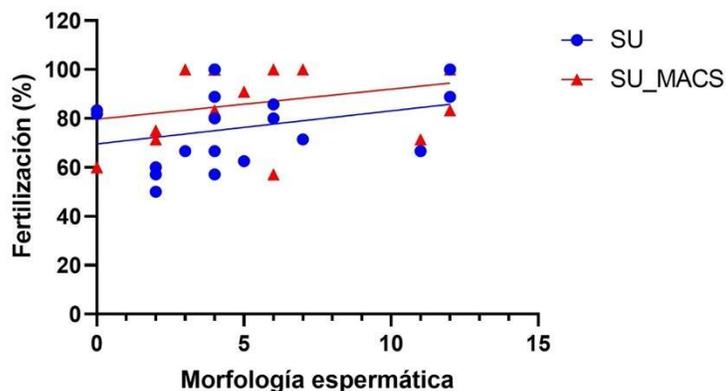


Figura 5. Correlación del porcentaje de fertilización con la morfología de la muestra en fresco. La tendencia para ambas técnicas fue positiva débil. En ningún caso se observó una relación estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Fragmentación embrionaria en día 2 y día 3

El análisis de correlación de Pearson para la fragmentación embrionaria con relación a la edad del paciente no mostró significancia estadística con ninguna técnica y en ningún día ($p=0.503$ y 0.905 para SU día 2 y 3, respectivamente; $p=0.254$ y 0.106 para SU-MACS día 2 y 3, respectivamente). De manera interesante las tendencias fueron inversas, siendo positiva débil para la técnica de SU en ambos días ($r=0.154$ y 0.030 para día 2 y 3, respectivamente) y negativa para la técnica de SU-MACS ($r=-0.275$ y -0.382 para día 2 y 3, respectivamente). El punto de intersección de ambas líneas es aproximadamente en 38 años, lo que plantea la posibilidad de que, a partir de esta edad, el uso de SU-MACS comienza a tener un efecto favorable en la selección de espermatozoides para ICSI (figuras 6 y 7).

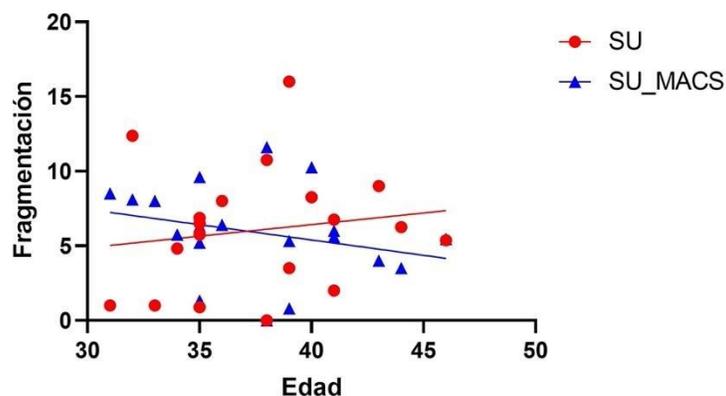


Figura 6. Correlación del porcentaje de fragmentación embrionaria en día 2 con respecto a la edad del varón. La tendencia para la técnica de SU es positiva débil, mientras que

para SU-MACS es negativa. En ambos casos no se observó una relación estadísticamente significativa ($p>0.05$).

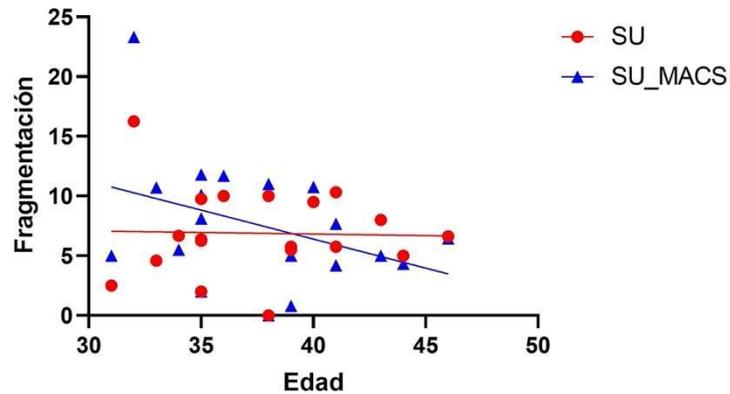


Figura 7. Correlación del porcentaje de fragmentación embrionaria en día 3 respecto a la edad del varón. La tendencia para la técnica de SU es positiva débil, mientras que para SU-MACS es negativa. En ambos casos no se observó una relación estadísticamente significativa ($p>0.05$).

En lo que respecta a la correlación de la fragmentación embrionaria y la edad de la mujer (figuras 8 y 9), se observa una tendencia negativa débil en todos los casos ($r=-0.098$ y -0.011 para SU día 2 y 3 respectivamente; $r=-0.140$ y -0.292 para SU-MACS día 2 y 3, respectivamente), sin encontrarse una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.690$ y 0.963 para SU día 2 y 3, respectivamente; $r=0.566$ y 0.225 para SU-MACS día 2 y 3, respectivamente).

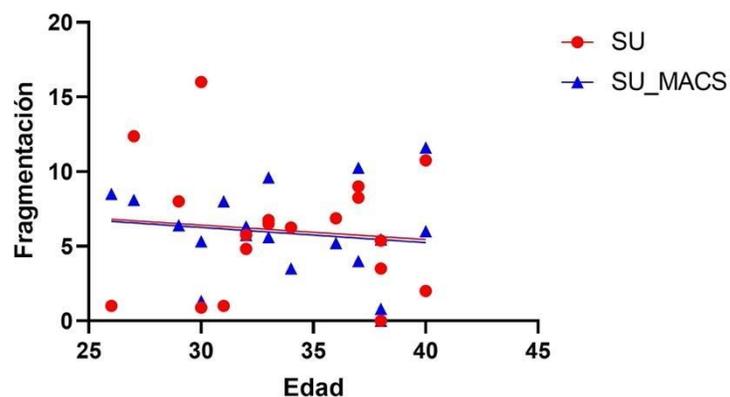


Figura 8. Correlación del porcentaje de fragmentación embrionaria en día 2 respecto a la edad de la mujer. La tendencia para ambas técnicas es negativa débil. En ningún caso se observó una relación estadísticamente significativa ($p>0.05$).

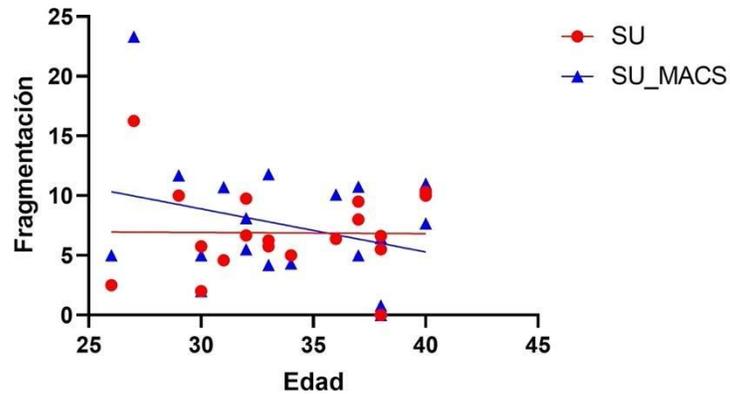


Figura 9. Correlación del porcentaje de fragmentación embrionaria en día 3 respecto a la edad de la mujer. La tendencia para la técnica de SU-MACS es negativa, mientras que para SU es negativa muy débil. En ningún caso se observó una relación estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Obtención de Blastocisto

Los datos analizados respecto a la correlación entre el porcentaje de obtención de blastocistos y la edad del paciente mostraron relaciones inversas entre las técnicas (figura 10). Para la técnica de SU la tendencia fue negativa débil, mientras que para SU-MACS la tendencia fue positiva débil. En ambos casos no hubo significancia estadística ($r = -0.227$, $p = 0.349$ para SU; $r = 0.144$, $p = 0.556$ para SU-MACS). El punto de intersección entre ambas líneas es aproximadamente a los 40 años, lo que parece tener congruencia con el comportamiento para la fragmentación embrionaria.

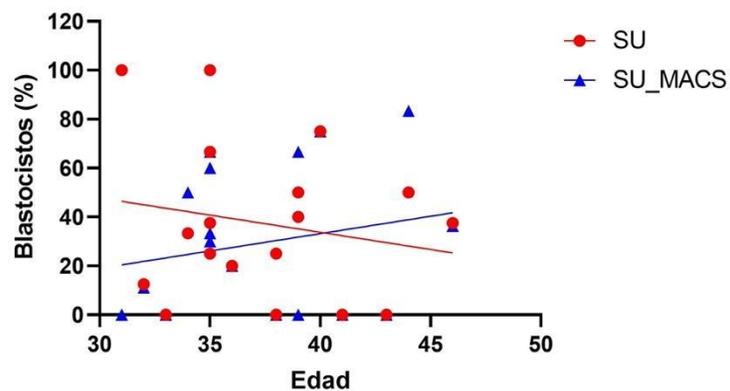


Figura 10. Correlación del porcentaje de blastocistos obtenidos en día 5 respecto a la edad del varón. La tendencia para la técnica de SU-MACS es positiva, mientras que para SU es negativa débil. En ningún caso se observó una relación estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

En contraste, la obtención de blastocistos respecto a la edad de la mujer mostró en ambas técnicas una correlación negativa no estadísticamente significativa ($r=-0.264$, $p=0.275$ para SU; $r=-0.157$, $p=0.520$ para SU-MACS) (figura 11).

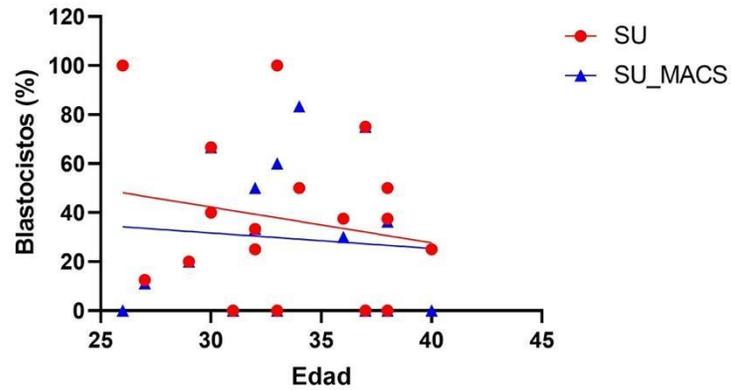


Figura 11. Correlación del porcentaje de blastocistos obtenidos en día 5 respecto a la edad de la mujer. La tendencia para a ambas técnicas fue negativa débil. En ningún caso se observó una relación estadísticamente significativa ($p>0.05$).

Discusión

El impacto del espermatozoide en el desarrollo embrionario ha sido propuesto como una condicionante de éxito en el proceso de implantación (Barroso et al., 2009). Se ha observado el efecto tardío de la contribución del factor masculino durante la activación genómica que se lleva a cabo entre el tercer y quinto día de desarrollo embrionario y que expresa relación directa con la formación del trofoectodermo. Asimismo, se ha relacionado una mayor presencia de enfermedades de origen placentario con un aumento en la incidencia de enfermedades hipertensivas del embarazo, prematuridad y bajo peso del recién nacido, y esto se relaciona con procesos de FIV/ICSI con factor masculino alterado (Barroso et al. 2018).

En primera instancia, nuestros resultados demostraron un incremento significativo en el IM y la MT al procesar las muestras espermáticas con la técnica de SU, el cual se pierde regresando a niveles similares a la muestra fresca al procesar los espermatozoides con MACS. Consideramos que dicho efecto no tiene relación con el uso del MACS, sino que se debe a los procesos de incubación durante la capacitación, ya que durante el SU la muestra fresca se incubó a 37°C, favoreciendo así el movimiento celular en dirección al medio de cultivo añadido sobre el paquete celular, lo que promueve el aumento de espermatozoides móviles en este medio. Por su parte, la diferencia de las muestras de SU y SU-MACS se deben principalmente a que la incubación con la anexina-V, que es la última etapa de procesamiento, se hace a temperatura ambiente lo que promueve que los espermatozoides se muevan más lentamente, y con ello los índices de movilidad y movilidad total disminuyan.

En la selección espermática con el MACS se eliminan espermatozoides con inicios de procesos apoptóticos, con ello se ha demostrado que el daño al ADN también disminuye, teniendo así una población espermática de mayor calidad respecto a la integridad del material genético. Se sabe que el daño al ADN puede consistir en rupturas de cadena simple o doble, y cuando el daño es del segundo tipo, la capacidad reparadora del ovocito es muy limitada (Casanova et al., 2018), mientras que el daño en cadenas sencillas puede ser reparado más eficientemente mediante las vías de escisión de base y escisión de nucleótido. Por lo tanto, se espera que si el espermatozoide inyectado posee poco daño en el ADN, la cromatina se descondensará adecuadamente, la

sustitución de protaminas por histonas dentro del ovocito se llevará a cabo y el pronúcleo se formará (Muriel et al., 2005).

Es importante mencionar que durante la técnica de capacitación los espermatozoides externalizan fosfatidilserina debido al procesamiento y no necesariamente por eventos apoptóticos. Debido a esto, se decidió modificar la metodología sugerida por el fabricante, usando una mayor cantidad de microbeads conjugadas con anexina V para así obtener un mayor grado de depuración en la muestra espermática.

Los parámetros seminales muestran una disminución en el potencial de la fertilidad con el aumento en la edad del varón, por lo que es de esperar que cuanto mayor edad tengan los pacientes sometidos a tratamientos de reproducción asistida, la calidad espermática se vea deteriorada. El uso de la técnica combinada SU-MACS enriquece la población espermática por lo que se esperaba que el porcentaje de fertilización fuera mayor. Sin embargo, el análisis estadístico indicó que no existe diferencia significativa entre el uso de espermatozoides capacitados con SU-MACS, a pesar de tener una tendencia positiva.

Se ha determinado que valores de fragmentación espermática $<30.7\%$ (Su et al., 2017) y $<27\%$ (Niu et al., 2011) están asociados con una alta tasa de obtención de embriones de calidad A en día 3, con lo cual se infiere que la fragmentación espermática tiene influencia sobre la calidad embrionaria temprana. Las mismas observaciones fueron obtenidas en otro estudio donde el valor límite de fragmentación corresponde a 30%, observándose que en embriones derivados de poblaciones con fragmentaciones espermáticas debajo de ese valor límite, generan embriones de alta calidad en día 3, así como una mayor tasa de obtención de blastocistos (Borges et al., 2019). Entre las causas externas de la fragmentación espermática se cuenta la edad avanzada del paciente, por lo que el uso de la técnica SU-MACS podría beneficiar la obtención de embriones de alta calidad. Los resultados de nuestro trabajo demuestran una correlación negativa entre la edad del paciente y la fragmentación embrionaria con el uso de SU-MACS, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En lo que respecta al incremento de la fragmentación embrionaria entre el día 2 y 3 con ambas metodologías empleadas, es un resultado esperado debido a que los días de observación son consecutivos y generalmente la fragmentación tiende a aumentar durante el desarrollo embrionario.

Para determinar la calidad embrionaria, principalmente se consideran dos parámetros, el número de blastómeras presentes según el día de desarrollo y la fragmentación embrionaria. El primer criterio no es de gran utilidad para analizar el impacto del MACS dado que no es una característica que se vea afectada por su utilización. Por otra parte, la fragmentación embrionaria pudiera ser un mejor parámetro para evaluar el efecto de la capacitación por SU-MACS en la calidad embrionaria. Sin embargo, es importante mencionar que la valoración de los embriones tiene un sesgo importante porque interviene el criterio del observador durante su valoración.

La calidad embrionaria no solamente depende de la fragmentación espermática, sino que la calidad ovocitaria puede generar embriones con un alto grado de fragmentación. En el presente estudio, se incluyeron parejas con infertilidad inexplicable, aunque sus estudios de fertilidad son normales, al observar los ovocitos al microscopio tenían características que denotan mala calidad. Por lo tanto, es posible que el incluir estos pacientes no permitiera observar diferencias significativas entre el uso de espermatozoides provenientes de SU con respecto a los capacitados con SU-MACS. Por consiguiente, consideramos que se deberá tomar en cuenta la calidad ovocitaria para futuros estudios.

Es un hecho que el genoma paterno participa más activamente entre los días 3 y 5 de desarrollo, por lo que se esperaba tener un mayor desarrollo en blastocistos con la técnica combinada, dado que con ayuda del MACS se reduce la fragmentación espermática que puede estar incrementada por la edad del paciente, entregando así al ovocito el material genético más íntegro. Asimismo, se ha propuesto que entre menos fragmentos se presenten, el contacto entre blastómeras aumenta facilitando así la comunicación entre células y favoreciéndose la formación del blastocisto (Fujimoto et.al.,2010). Nuestros datos no muestran una significancia estadística en la correlación de la edad del paciente y la obtención de blastocistos a pesar de observar una tendencia positiva con la técnica de SU-MACS, por lo que podemos descartar una posible relación entre estos parámetros.

En un estudio previo, se encontró que la capacitación espermática con las técnicas combinadas de SU y MACS tiene un impacto positivo en el resultado de técnicas de reproducción asistida de alta complejidad, ya que se logró disminuir el arresto embrionario y aumentar las tasas de

implantación, el embarazo clínico y los bebés nacidos vivos (Barroso et al., 2018). Estos datos contrastan de manera importante con los resultados obtenidos en este trabajo, sin embargo, es importante considerar varias limitantes. En primer lugar, el tamaño de la muestra es reducido, por lo que la potencia estadística no es adecuada para poder concluir con certeza que la técnica de SU-MACS no tiene influencia sobre la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. Otra limitante de nuestro estudio es que no se determinó la fragmentación de ADN en muestras después de la técnica de capacitación aplicada, por lo que es posible que las poblaciones espermáticas para cada grupo de estudio fueran muy similares en términos de fragmentación espermática, de modo que ambas poblaciones celulares, tanto la capacitada mediante SU, como la que se obtiene después de hacer SU-MACS, pudieran tener un índice de fragmentación entre bajo y medio (<30%). Otro factor por considerar es que el uso de la técnica de fertilización ICSI haya tenido influencia en todos los parámetros analizados, debido a que, a pesar del enriquecimiento de la muestra seminal, es el operador quien bajo su criterio elige que espermatozoide se va a inyectar, lo que deja de lado las ventajas a nivel molecular que puede representar el MACS. Para evaluar de manera fidedigna el potencial de mejora que puede presentar el MACS en el desarrollo embrionario temprano, se debería utilizar en técnicas como fertilización in vitro. Finalmente, el incluir varias patologías asociadas al factor masculino (teratozoospermia, astenozoospermia, oligospermia e infertilidad inexplicable) pudo enmascarar los resultados.

Por lo anterior, consideramos que es necesario aumentar el tamaño de muestra para determinar con certeza si la tendencia al incremento en la tasa de fertilización asociada al uso de la técnica SU-MACS es real. Asimismo, el aumento del número de pacientes no permitirá evaluar el efecto de MACS en diferentes patologías relacionadas a la infertilidad. Otro aspecto importante que se debe abordar es el uso del MACS con otras técnicas de reproducción asistida como FIV o IAH, para evaluar su impacto en distintos parámetros tales como fragmentación embrionaria y obtención de blastocistos.

Conclusiones

Pese a que parece existir influencia de la técnica SU-MACS en algunos parámetros observados, el análisis estadístico descarta cualquier influencia del uso de MACS en el desarrollo embrionario temprano cuando se utiliza la técnica de ICSI. Es necesario fortalecer el diseño experimental, de modo que sea posible determinar si la utilización del MACS tiene un efecto importante en la población espermática de estudio, y por tanto en el desarrollo embrionario subsecuente. Para tal fin, se requiere incrementar el número de parejas en estudio para hacer una categorización más adecuada del impacto del MACS en distintas patologías, así como la inclusión de TRA que pongan de manifiesto la mejora en la fisiología del espermatozoide como FIV ó IAH. Además, incluir técnicas como fragmentación de DNA espermático o bien, medir la morfología espermática, que denoten la mejora antes y después de la aplicación del MACS.

El uso de tecnologías emergentes pueden coadyuvar en la determinación acerca del beneficio del uso del MACS para la obtención de embriones de buena calidad, así como su adhesión como técnica de uso común en el laboratorio de reproducción asistida.

Referencias Bibliográficas

Referencias

- 1) Aitken, R. J. (2020). The Male Is Significantly Implicated as the Cause of Unexplained Infertility. *Seminars in Reproductive Medicine*, 38(01), 003–020.
- 2) Asadi A., Ghahremani R., Abdolmaleki A., Rajaei F. (2021). Role of sperm apoptosis and oxidative stress in male infertility: A narrative view. *Int Reprod Biomed*. 19(1). 493-504.
- 3) Babakhanzadeh E., Nazari M., Ghasemifar S., Khodadian A. (2020). Some of the factors Involved in Male Infertility: A Prospective Review. *International Journal of General Medicine*, 13(1), 29-41.
- 4) Barroso Villa G, Colín-Valenzuela A, Morales-Velázquez M, Osuna-Zazueta M, Robledo-Trejo G, Ávila-Lombardo R. (2012). Efecto de la aplicación de columnas de anexina en los resultados reproductivos de parejas infértiles. *Ginecología y Obstetricia de México*;80(1):16-21.
- 5) Barroso-Villa, G., Valdespin-Fierro, C., Álvarez-Lozano, A., García-Montes, L. D., Robledo-Trejo, G., & Ávila-Lombardo, R. (2018). Efecto en los resultados reproductivos con la “magnetic-activated cell sorting (MACS)” para la eliminación de espermatozoides positivos a anexina V en parejas con infertilidad inexplicable. *Ginecología y Obstetricia de México*, 9.
- 6) Benchaib M., Braun V., Lornage J., Hadj S., Salle B., Lejeune H., Guerin J., (2003) Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction*, 18(5), 1023-1028.
- 7) Berteli, T. S., Da Broi, M. G., Martins, W. P., Ferriani, R. A., & Navarro, P. A. (2017). Magnetic-activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high-quality spermatozoa. *Andrology*, 5(4), 776–782.
- 8) Briseño L., Díaz I., Gómez C., et al. (2008) Varicocele e Infertilidad Masculina., *Revista Urología Colombiana*, 17(1), 63-69
- 9) Bucar, S., Gonçalves, A., Rocha, E., Barros, A., Sousa, M., & Sá, R. (2015). DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(1), 147–154.
- 10) Cakar, Z., Cetinkaya, B., Aras, D. et al. (2016). Does combining magnetic-activated cell sorting with density gradient or swim-up improve sperm selection?. *J Assist Reprod Genet* 33, 1059–1065.
- 11) Carballo-Mondragón E, Campos- Cañas JA, Ortiz-Reyes H, Kably-Ambe A. (2011). Comparación de tres métodos de capacitación espermática para ICSI en pacientes con morfología anormal. *Rev Mex Reprod*, 4(2):68-71.
- 12) Corral J., Balleca J., (2012). Varicocele: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Revisión. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana*. 29(2). 129-154.
- 13) Daniel R., Brandan N., Jeréz J., (2012) Apoptosis., *Cátedra de Bioquímica., Facultad de Medicina UNNE.*, 1-6.
- 14) Edwards R., Rísquez F., et al. (2003) *Reproducción asistida Moderna*. 1ra Ed. Argentina.
- 15) Grunewald, S., Paasch, U., Said, T. M., Rasch, M., Agarwal, A., & Glander, H.-J. (2006). Magnetic-activated Cell Sorting before Cryopreservation Preserves Mitochondrial Integrity in Human Spermatozoa. *Cell and Tissue Banking*, 7(2), 99–104.
- 16) Haddock, L., Gordon, S., Lewis, S. E. M., Larsen, P., Shehata, A., & Shehata, H. (2021). Sperm DNA fragmentation is a novel biomarker for early pregnancy loss. *Reproductive BioMedicine Online*, 42(1), 175–184.
- 17) Hamilton, T. R. dos S., & Assumpção, M. E. O. D. (2020). Sperm DNA fragmentation: Causes and identification. *Zygote*, 28(1), 1–8.
- 18) Hanson B.M., Kaser D.J., Franasiak J.M., (2020). Male Infertility and the future of In Vitro Fertilization. *Urologic Clinics of North America*. 47(2), 257-270.

- 19) Jeřeta, M., Boženková, E., Žáková, J. Ž., Ventruba, P., Crha, I., Lousová, E., Coufalová, P., & Kempisty, B. (2018). Magnetic-Activated Cell Sorting in Combination with Swim-Up Efficiency Improve Effectivity of Spermatozoa Separation. *Medical Journal of Cell Biology*, 6(2), 55–60.
- 20) Middelkamp S., Van Tol H., Spierings D., Boymnas S., Guryev V., Roelen B., Lansdorp P., Cuppen E., Kujik E., (2020). Sperm DNA damage causes genomic instability in early embryonic development. *Science Advances*, 6(16), 1-12.
- 21) Nanassy, L., & Carrell, D. T. (2008). Paternal effects on early embryogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction*, 5(1), 2.
- 22) Nasr-Esfahani M., Salehi M., Razavi S., Anjomshoa M., Rozbahani S., Moulavi F., Mardani M., (2005) Effect of sperm DNA and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI, *Reproductive Biomedicine*, 11(2), 198-205.
- 23) Remohí J., Bellver J., Domingo J., Bosch E., Pellicer., (2008). Manual Práctico de esterilidad y reproducción humana. 3ra Ed. 475-484.
- 24) Romany L., Garrido N., Motato Y., Aparicio B., Remohí H., Meseguer M., (2014). Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. *Fertility and Sterility*. 102(6), 1567-1575.
- 25) Pacheco, A., Blanco, A., Bronet, F., Cruz, M., García-Fernández, J., & García-Velasco, J. A. (2020). Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS): A Useful Sperm-Selection Technique in Cases of High Levels of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Clinical Medicine*, 9(12), 3976.
- 26) Quintero G., Bermudez R., Castillo J., (2015), Infertilidad masculina y fragmentación del DNA espermático: Un problema actual. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. 18(2), 144-151.
- 27) Rabinowitz, M., Huffman, P., Haney, N., Khon, T., (2021). Y-chromosome microdeletions: A review of prevalence, screening, and clinical considerations. *The application of clinical genetics*, 14, 51-59.
- 28) Said T., Grindelwald S., Paasch U., Rasch M., Agarwal A., Glander H., (2005). Effects of magnetic activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertility and Sterility* 83(5), 1442-1446.
- 29) Samano G., Rodríguez A., López B., Chávez J., Arenas E., (2020). La fosfatidilserina en el espermatozoide: marcador apoptótico e indicador de potencial fértil. *Revista Iberoamericana de ciencias*. 7(3), 71-82.
- 30) Sheikhi A., Jalali M., Gholamian M., Jafarzadeh A., Jannati S., Mousavifar N., (2013) Elimination of apoptotic spermatozoa by magnetic-activated cell sorting improves the fertilization rate of couples treated with ICSI procedure. *Andrology*. 1(1). 845-849.
- 31) Simon, L., Murphy, K., Shamsi, M. B., Liu, L., Emery, B., Aston, K. I., Hotaling, J., & Carrell, D. T. (2014). Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction*, 29(11), 2402–2412.
- 32) Tavalae, M., Deemeh, M. R., Arbabian, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2012). Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: Which technique is more useful for clinical sperm selection? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(1), 31–3.
- 33) Taylor S.L., Weng S.L., Fox P., Duran E.H., Morshedi M. S., Oehninger S., Beebe S.J., (2004) Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality, *Molecular Human Reproduction*, 10(11), 825-834.
- 34) Tejeiro J.M., Munuce M.J., Caille A.M., Zumoffen C., Marini P.E., (2017) Use of annexin V based sperm selection in assisted reproduction. *Andrology*, 6(1), 1-10.
- 35) Tsung-Hsien L., Chung-Hsien L., Yang-Tse S., Hui-Mei T., Chun-Chia H., Hsiu-Hui C., and Maw-Sheng L., (2010), Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility *Human Reproduction*, Vol.25, No.4 pp. 839–846.
- 36) Virro M. R., Larson-Cook K.L., Evenson P.D., (2004) Sperm chromatin structure assay (SCSA®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, *Fertility and Sterility*, 81(5), 1289-1295.
- 37) Wdowiak A., Bojar I., (2015), Relationship between pregnancy, embryo development, and sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics. *Saudi Journal of Biological Science*, 23(1), 598-606.
- 38) World Health Organization. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. Geneva: World Health Organization.

- 39) Zahra B., Fardin A., Iraj A., Zahra Z., Chad M., Fatemeh M., Sadegh A., Morteza K. (2020) Male Factors: the Role of Sperm in Preimplantation Embryo Quality. *Reproductive Sciences*, Noviembre.
- 40) Ziarati, N., Tavalaei, M., Bahadorani, M., & Nasr Esfahani, M. H. (2019). Clinical outcomes of magnetic activated sperm sorting in infertile men candidate for ICSI. *Human Fertility*, 22(2), 118–125.

Bibliografía

- 1) Alvarez C., Bilinski M., Lorenzi D., Uriondo H., Noblía F., Longobucco V., Ventimiglia E., Nodar F. (2017) Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects.
- 2) Dhawan, V., Kumar, M., Deka, D., Malhotra, N., Singh, N., Dadhwal, V., & Dada, R. (2019). Paternal factors and embryonic development: Role in recurrent pregnancy loss. *Andrologia*, 51(1), e13171.
- 3) Dirican, E. K., Özgün, O. D., Akarsu, S., Akin, K. O., Ercan, Ö., Uğurlu, M., Ünsal, A. (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(8), 375–381.
- 4) Ferreyra, J. G. (2014). High Pregnancy and Implantation Rates Can Be Obtained Using Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) to Selection Spermatozoa in Patients with High Levels of Spermatid DNA Fragmentation. *Journal of Fertilization: In Vitro - IVF-Worldwide, Reproductive Medicine, Genetics & Stem Cell Biology*, 03(01).
- 5) Fujimoto, V. Y., Browne, R. W., Bloom, M. S., Sakkas, D., & Alikani, M. (2010). Pathogenesis, developmental consequences, and clinical correlations of human embryo fragmentation. *Fertility and Sterility*, 95(4), 1197–1204.
- 6) Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 38(4), 979–986.
- 7) Gil, M., Sar-Shalom, V., Melendez Sivira, Y., Carreras, R., & 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(4), 479–485.
- 8) Harris, I. D., Fronczak, C., Roth, L., & Meacham, R. B. (s/f). *Fertility and the Aging Male*. 7.
- 9) Hnida, C., & Ziebe, S. (2004). Total Cytoplasmic Volume as Biomarker of Fragmentation in Human Embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 21(9), 335–340.
- 10) Horta F., Crosby J., Mackenna A., Huidobro C., (2016). Male Factor Infertility Outcomes Using Magnetic Activated Cell Sorting in Intra Cytoplasmic Sperm Injection Cycles., *Andrology (Los angel)*, 5(1).
- 11) Jin, J., Pan, C., Fei, Q., Ni, W., Yang, X., Zhang, L., & Huang, X. (2015). Effect of sperm DNA fragmentation on the clinical outcomes for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in women with different ovarian reserves. *Fertility and sterility*, 103(4), 910–916.
- 12) Kim, S. M., Kim, S. K., Jee, B. C., & Kim, S. H. (2019). Effect of Sperm DNA Fragmentation on Embryo Quality in Normal Responder Women in In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Yonsei Medical Journal*, 60(5), 461.
- 13) Kristiansen, K. (s/f). *Maternal and paternal contribution to the development of human preimplantation embryos*. 117.
- 14) Lee, T.-H., Liu, C.-H., Shih, Y.-T., Tsao, H.-M., Huang, C.-C., Chen, H.-H., & Lee, M.-S. (2010). Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Human Reproduction*, 25(4), 839–846.
- 15) Morey-León, G., Puga-Torres, T., Blum-Rojas, X., González-González, M., Narváez-Sarasti, A., & Sorroza-Rojas, N. (2020). Caracterización de la calidad del semen en hombres atendidos en un centro de reproducción asistida en Guayaquil, Ecuador. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 37(2), 292–296.
- 16) Motato-Moscoso, Y., Ortega-García, A., & Espejo-Catena, M. (2017). La selección espermática mediante técnica de separación magnética de células activadas (MACS) en las técnicas de reproducción asistida. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*, 4(3), 162–169.
- 17) Muriel, L., Garrido, N., Fernández, J. L., Remohí, J., Pellicer, A., de los Santos, M. J., & Meseguer, M. (2006). Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin

- dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 85(2), 371–383.
- 18) Nadalini M., Tarozzi N., Di Santo M., Borini. A., (2014)Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better then the traditional one?, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31:1045–1051.
 - 19) Niloofar Z., Marziyeh T., Mehrnoosh B. & Mohammad E. (2018): Clinical outcomes of magnetic activated sperm sorting in infertile men candidate for ICSI, *Human Fertility*.
 - 20) Oleszczuk, K., Giwercman, A., & Bungum, M. (2016). Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome. *Andrology*, 4(2), 290–296.
 - 21) Sedó, C. A., Bilinski, M., Lorenzi, D., Uriondo, H., Noblía, F., Longobucco, V., Lagar, E. V., & Nodar, F. (2017). Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: Clinical and biological aspects. *JBRA Assisted Reproduction*.
 - 22) Stigliani, S., Anserini, P., Venturini, P. L., & Scaruffi, P. (2013). Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Human Reproduction*, 28(10), 2652–2660.
 - 23) Stimpfel, M., Verdenik, I., Zorn, B., & Virant-Klun, I. (2018). Magnetic-activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa improves the quality of embryos according to female age: A prospective sibling oocyte study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(9), 1665–1674.
 - 24) Su M., Seul K., Byung C., Seok H., (2019). Effect of Sperm DNA Fragmentation on Embryo Quality in Normal Responder Women in In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Yansei Medical Journey*. May;60(5):461-466.
 - 25) Sutovsky, P., & Schatten, G. (1999). Paternal Contributions to the Mammalian Zygote: Fertilization after Sperm-Egg Fusion. En *International Review of Cytology* (Vol. 195, pp. 1–65). Elsevier. .
 - 26) Tolmacheva, E. N., Vasilyev, S. A., & Lebedev, I. N. (2020). Aneuploidy and DNA Methylation as Mirrored Features of Early Human Embryo Development. *Genes*, 11(9), 1084.
 - 27) Torres, M. A. G., & Rawe, V. (2010). *Fragmentación del ADN espermático: Su dinámica en el tiempo y la importancia de ir más allá de lo evidente*. 25, 7.
 - 28) Turner, K. A., Rambhatla, A., Schon, S., Agarwal, A., Krawetz, S. A., Dupree, J. M., & Avidor-Reiss, T. (2020). Male Infertility is a Women’s Health Issue—Research and Clinical Evaluation of Male Infertility Is Needed. *Cells*, 9(4), 990.
 - 29) Varghese, A. C., Bragais, F. M., Mukhopadhyay, D., Kundu, S., Pal, M., Bhattacharyya, A. K., & Agarwal, A. (2009). Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Andrologia*, 41(4), 207–215.
 - 30) Xue, L.-T., Wang, R.-X., He, B., Mo, W.-Y., Huang, L., Wang, S.-K., Mao, X.-B., Cheng, J.-P., Huang, Y.-Y., & Liu, R. (2016). Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcomes for Chinese couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Journal of International Medical Research*, 44(6), 1283–1291.
 - 31) Yanagimachi, R. (2005). Male Gamete Contributions to the Embryo. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1061(1),203–207.

Apéndice

En esta sección se muestran imágenes tomadas con ayuda del microscopio, para un mejor entendimiento del desarrollo embrionario temprano, comprendido entre el día 1 y el día 5 post-inyección. Se muestran las diferentes etapas vistas en el laboratorio de *Fertilización In vitro*, desde el ovocito fecundado, hasta el blastocisto, pasando por las segmentaciones características en día 2 y 3.



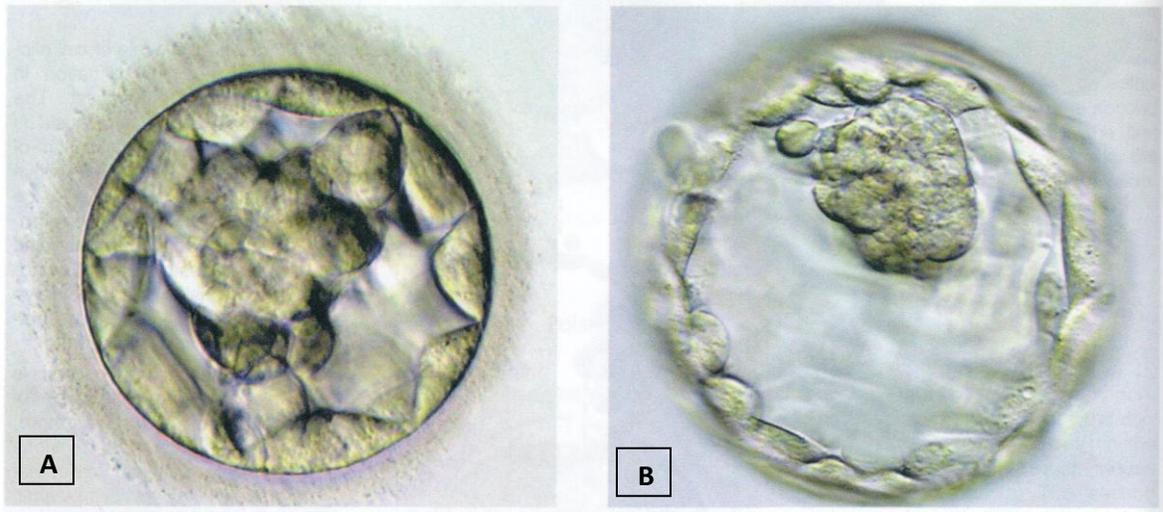
Figura 12: Ovocitos fecundados. En la panel A se observa un ovocito fecundado con 2 pronúcleos lo que es considerado como el patrón normal, mientras que en el panel B, se observa un ovocito fecundado con 3 pronúcleos el cual es considerado como patrón anormal.



Figura 13: Microscopia de embriones en día 2. En la figura 13A se observa un embrión de buena calidad en día 2, posee 4 blastómeras simétricas sin fragmentación embrionaria. En la figura 13B se observa un embrión de buena calidad de día 3, se ven 8 blastómeras simétricas sin fragmentación embrionaria.



Figura 14: Microscopia de embriones en día 3, donde se observan 4 embriones con blastómeras asimétricas así como la presencia de fragmentación embrionaria de entre 10 y 20 %.



Figuras 15: Microscopia de blastocistos donde se observa el desarrollo de la masa celular y el trofoectodermo al final del día 4 (A) y al inicio del día 5 (B).