

Separación magnética por columnas de anexinas V: “filtrado molecular” para la selección de espermatozoides no apoptóticos

Vanesa Rawe, Gustavo Álvarez, Heydy Uriondo, Sergio Papier, Sandra Miasnik, Florencia Nodar

Reproducción 2009; 24: 104-114

Resumen

Objetivo: La presencia de una elevada cantidad de espermatozoides apoptóticos tiene un impacto negativo en los resultados de reproducción asistida. La exposición de fosfatidilserina en los espermatozoides pre-apoptóticos es una propiedad que sirve para poder detectarlos y separarlos de la población afectada. La detección se logra por incubación con anexina V acoplada a pequeñas esferas metálicas y la separación se lleva a cabo a través del pasaje por un campo magnético. El objetivo del presente trabajo fue optimizar la integración de este nuevo método de “filtrado molecular” de espermatozoides y probar su eficacia en la remoción de espermatozoides apoptóticos.

Diseño: Descriptivo/experimental.

Materiales y métodos: Se analizaron 18 muestras de semen que previamente realizaron estudios de fragmentación de ADN espermático por la técnica de TUNEL y fueron agrupadas en 4 grupos: fragmentación del ADN $\geq 20\%$ con inmovilidad total (Grupo I) o con grados variables de movilidad (Grupo II), con fragmentación del ADN 10-20% (Grupo III) y con fragmentación del ADN $\leq 10\%$ (Grupo IV). Se realizó *Swim-up* o Gradiente y pasaje de la suspensión de espermatozoides por las columnas de anexina V según especificaciones del proveedor. Se estudiaron 3 poblaciones: la recuperada luego del *Swim-up* o Gradiente (fracción inicial), la filtrada por la columna de anexina V (fracción negativa) y la adherida a la matriz magnética (fracción positiva) evaluando la fragmentación del ADN (TUNEL), caspasa-3 activa (Inmunofluo-

rescencia), movilidad y sobrevivida. El análisis fue por microscopía de epifluorescencia y el estadístico usado fue ANOVA.

Resultados: Promedio de niveles de fragmentación del ADN y caspasa-3 activa en las diferentes fracciones y grupos.

Grupos	FRACCIÓN INICIAL		FRACCIÓN NEGATIVA		FRACCIÓN POSITIVA	
	TUNEL	CASPASA-3	TUNEL	CASPASA-3	TUNEL	CASPASA-3
Grupo I	35,50%	8,00% ^{NS}	17,00%	3,50% ^{NS}	82,50%	31,50% ^{NS}
Grupo II	25,62%	11,12%	8,5%	3,12%	51,62%	14,12%
Grupo III	15,33%	13,67% ^{NS}	6,33%	6,00% ^{NS}	35,33%	18,00% ^{NS}
Grupo IV	6,50%	7,50% ^{NS}	3,00%	2,00% ^{NS}	32,00%	13,00% ^{NS}

Dentro de cada grupo se compararon los valores de TUNEL y caspasa-3 de cada una de las tres fracciones estudiadas. Los valores de TUNEL en todos los casos y caspasa-3 en el Grupo II son significativamente diferentes ($p < 0,03$). Movilidad y sobrevivida no fueron diferentes en ninguna población. NS: no significativo.

Conclusión: el uso de columnas de anexinas V no afecta la movilidad ni sobrevivida y es muy efectivo en la remoción de espermatozoides apoptóticos. La fracción negativa muestra niveles normales de fragmentación del ADN y caspasa-3 activa en todos los grupos. Los espermatozoides apoptóticos quedan retenidos en la columna (fracción positiva). Este novedoso método demuestra la ventaja de la filtración molecular en la separación de espermatozoides apoptóticos, lo cual podría optimizar los resultados de técnicas de reproducción asistida.

Correspondencia: Vanesa Rawe
E-mail: vanerawe@hotmail.com

Introducción

Las técnicas de Reproducción Asistida se han transformado en el tratamiento de elección en casos de infertilidad femenina y masculina, pero sin embargo, las tasas de embarazo permanecen en niveles subóptimos en los casos de factor masculino severos (ASRM, 2004). La calidad de los espermatozoides es uno de los factores que determinan el éxito de las técnicas de reproducción asistida (Ombelet y col, 2003). Desde el nacimiento de la primera bebé por Fertilización *in Vitro* (FIV), quedó establecido que la unión *in vitro* de gametas humanas podía generar un embrión y embarazo viable (Stephoe y Edwards, 1978). En la década de los 80' los pioneros estudios acerca de la importancia de la morfología espermática en los resultados de FIV hablaban de la contribución paterna durante el desarrollo embrionario (Kruger y col, 1988). En la década de los 90' la introducción de la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) revolucionó la medicina reproductiva (Palermo y col, 1995) y el estudio del factor masculino pareció perder validez ya que se tendía a pensar que la inyección intracitoplásmica de casi cualquier espermatozoide generaba embarazo. Un tiempo más tarde, el estudio profundo del espermatozoide por técnicas de biología celular y molecular más sofisticadas permitió identificar los trastornos subyacentes en la gameta masculina y el diagnóstico patológico ganó nuevo reconocimiento. Nació de esta manera el estudio de la patología de las gametas y cómo ésta impacta en los resultados de reproducción asistida (Chemes y Rawe 2003, 2006).

A pesar de que el análisis convencional de una muestra de espermatozoides brinda considerable información acerca de las características de la misma, no es informativo acerca de la presencia de eventos de muerte celular programada (apoptosis) que pueden ser en gran medida responsables de una baja tasa de fecundación e implantación (Boe-Hansen y col, 2006; Avendaño y col, 2008). El papel de la apoptosis ha sido bien caracterizado en una serie de enfermedades somáticas, pero está muy pobremente definido en la patogénesis de la infertilidad masculina (Oehninger y col, 2003). Los espermatozoides del eyaculado muestran características que son típicas de los eventos de apoptosis como ser la traslocación de fosfatidil-

serina de la membrana plasmática, la activación de caspasa-3 y la disminución del potencial de membrana mitocondrial (Glander y Schaller, 1999; Weng y col, 2002; Paasch y col, 2003, 2004a).

Teniendo en cuenta la importancia del estudio de la fragmentación del ADN espermático junto con marcadores de apoptosis celular, surge la pregunta acerca de las opciones terapéuticas ante la presencia de un alto porcentaje de espermatozoides afectados. En los últimos años han surgido distintas alternativas para tratar de brindar mejores resultados reproductivos a pacientes con altos niveles de espermatozoides con ADN fragmentado. Greco y col, 2005a y b, postularon que el uso de antioxidantes orales en un período de 2- 3 meses previo al tratamiento de ICSI no mejora las tasas de fecundación y clivaje embrionario, pero sí mejora las tasas de implantación (19,6% versus 2,2%) y embarazo (48,2% versus 6,9%) de manera significativa con respecto al grupo de pacientes con daño en el ADN espermático que no tomaron antioxidantes. Los autores concluyen que el tratamiento con antioxidantes en pacientes con daño en el ADN espermático antes del ICSI mejora el pronóstico reproductivo. Por otro lado, otros autores afirman que el uso de antioxidantes no mejora los resultados del tratamiento de ICSI de manera significativa y que se deben considerar las causas que originan la ruptura del ADN espermático (Martin-Du y Sakkas, 1998; Bolle y col, 2002).

Otra posible opción terapéutica a la presencia de un elevado porcentaje de espermatozoides apoptóticos en el eyaculado es la realización de una biopsia de testículo ya que se postula que la tasa de fragmentación del ADN espermático es marcadamente menor en el testículo si se la compara con el eyaculado (Greco y col, 2005c). Los autores no hallaron diferencias en términos de tasa de fecundación o calidad embrionaria en casos de ICSI en donde se usaron espermatozoides de eyaculado versus espermatozoides de testículo. Sin embargo, se lograron ocho embarazos clínicos (cuatro simples y cuatro dobles) luego de ICSI con espermatozoides de testículo (tasa de embarazo 44,4% y tasa de implantación 20,7%), mientras que solo se obtuvo un embarazo luego de ICSI con espermatozoides de eyaculado con altos niveles de fragmentación del ADN. Ese único embarazo

terminó en aborto temprano tiempo más tarde. Los autores concluyen que la biopsia de testículo en ICSI constituye un modo de omitir el pasaje por el epidídimo (lugar donde ocurre el mayor daño en el núcleo del espermatozoide, Ramos y col, 2004) y es la primera opción en el tratamiento del factor masculino con altos niveles de fragmentación del ADN espermático.

En búsqueda de un método no invasivo que permita dar solución a los altos niveles de apoptosis celular en espermatozoides, distintos grupos de trabajo describieron el uso de anexina V acoplada a pequeñas esferas metálicas recubiertas por polímero biodegradable (~50 nm en diámetro). Las mismas pueden ser usadas para separar espermatozoides muertos y apoptóticos cuando se los expone a un campo magnético de alto poder en una columna. Este procedimiento de separación o filtrado molecular se denomina *Magnetic-Activated Cell Sorting* - MACS o separación magnética por columnas de anexina V. El principio consiste en que los espermatozoides con externalización de fosfatidilserina y membranas plasmáticas deterioradas se unirán a anexina V que, acopladas a las microesferas, quedarán adheridas a la columna de separación. Por otro lado, los espermatozoides no apoptóticos con membranas intactas no se unirán a anexina V y pasarán libremente a través de las columnas (Miltenyi y col, 1990; Grunewald y col, 2001; Paasch y col, 2003, 2004b). De esta manera se logra la selección de espermatozoides no apoptóticos y se enriquece la muestra de espermatozoides que podrían llegar a ser usados en técnicas de reproducción asistida de alta complejidad (ICSI).

El presente trabajo pretende dar respuestas a las siguientes preguntas sobre la técnica de separación de espermatozoides pre-apoptóticos por columnas de anexina V:

1. ¿Podemos mejorar los valores de apoptosis y fragmentación del ADN espermático de las muestras afectadas? Es decir, ¿podemos mimetizar los valores obtenidos por los grupos de trabajo internacionales y de esta manera validar la técnica? ¿Cuán eficaz es la técnica en nuestras manos?
2. ¿Cómo funcionan las columnas con distintas muestras de semen? ¿Son los resultados dependientes de las características basales de las muestras?
3. ¿Se afecta la movilidad final luego del uso de las columnas de anexina V? ¿Se afecta la sobrevivencia de la muestra?

Materiales y métodos

Con el propósito de llevar a cabo este proyecto de investigación, realizamos un análisis de pacientes varones que habían realizado estudios de fragmentación de ADN espermático por la técnica de TUNEL acoplado a fluorescencia. Las muestras fueron sometidas a métodos de separación (*Swim-up* o Gradiente) y luego se realizó el pasaje de la suspensión de espermatozoides por las columnas de anexina V (ver detalles de metodología luego). Se tomaron en cuenta 3 poblaciones de espermatozoides: 1) la recuperada luego del *Swim-up* o Gradiente (fracción inicial), 2) la filtrada luego del pasaje por la columna de anexina V (fracción negativa) y 3) la adherida a la matriz magnética (fracción positiva). Sobre estas poblaciones se evaluó la fragmentación del ADN (TUNEL), presencia de caspasa-3 activa (Inmunofluorescencia), movilidad y sobrevivencia. La visualización de los resultados se realizó mediante microscopía de epifluorescencia.

1. Población de estudio

Diez y ocho pacientes a los cuales se les había realizado previamente un espermograma básico y un estudio de fragmentación del ADN por la técnica de TUNEL fueron agrupados de la siguiente manera: Grupo I (con movilidad total 0% y con valores de fragmentación del ADN $\geq 20\%$), Grupo II (con variada movilidad espermática y con valores de fragmentación del ADN $\geq 20\%$), Grupo III (con valores de fragmentación del ADN entre 10-20%) y Grupo IV (con valores de fragmentación del ADN $\leq 10\%$).

En el día del ensayo de columnas de anexina V las muestras de semen de cada paciente fueron procesadas según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999). La separación espermática se realizó por Gradiente o *Swim-up*.

La puesta a punto de la técnica (condiciones de temperatura, tiempos, etc) nos permitió ajustar las variables óptimas y considerar finalmente informativos a 15 de los 18 pacientes iniciales.

2. Selección de espermatozoides

a) Gradiente: se empleó el gradiente ISOLATE (*Irvine Scientific*, CA) siguiendo los métodos convencionales de trabajo según proveedor. En

el *pellet* obtenido se evaluó la concentración y movilidad de los espermatozoides y se procedió a ajustar la cantidad a un valor máximo de 10×10^6 espermatozoides /ml. Seguidamente, se lavó con el *buffer* de pegado (*Binding buffer 1X, Miltenyi Biotec, Alemania*) centrifugando por 5 minutos a 300g.

b) *Swim-up*: en un tubo cónico de centrifuga se colocó 1ml de semen y sobre este último 1ml de H-HTF (Fluido Tubárico Humano con HEPES) suplementado con 15% SSS (Suero Substituto Suplementado) (*Irvine Scientific, CA*), se dejó incubar por 1 hora a 37°C en ángulo de 45°. Al término de la incubación se recuperaron 500 µl de la fracción superior y se procedió a evaluar y ajustar la concentración de la misma manera que el método anterior. Seguidamente se lavó 2 veces con el *buffer* de pegado debido a que el Ca^{2+} debe ser retirado totalmente de la suspensión. Como último paso, en ambos métodos se retiró el sobrenadante del lavado final y el *pellet* obtenido fue empleado para el paso siguiente de las columnas de anexina V (*Miltenyi Biotec*).

3. Columnas de anexina V

El protocolo empleado para separación de espermatozoides apoptóticos fue adaptado a partir de las sugerencias del proveedor (*Death Cell Removal Kit, Miltenyi Biotec, Alemania*). Brevemente, los pasos seguidos se ilustran en la Figura 1. El material empleado durante el protocolo es estéril y el trabajo es realizado bajo flujo laminar (Figura 1A). Seguidamente, el *pellet* de espermatozoides obtenido (ver “Selección de espermatozoides”) es resuspendido en 100 µl de *microbeads* (anexinas adheridas a esferas de metal recubiertas por polímero biodegradable) (Figura 1B), y luego la suspensión es colocada en un pocillo de 0,6 cm de diámetro (Figura 1C) donde es incubada por 20 minutos a 25°C con agitación constante (Figura 1D). Minutos antes de concluir el tiempo de incubación se coloca la columna separadora estéril dentro del magneto que se encuentra asociado a un soporte metálico. Se procede a hidratar la columna con 500 µl de *buffer* de pegado 1X. Inmediatamente se coloca la suspensión de espermato-

zoides asociadas con las esferas de metal (*beads*) y se adicionan 500 µl del *buffer* de pegado (Figura 1E). El eluido o fracción negativa es colectado en un tubo de 2mL que contiene 500 µl de H-HTF suplementado con 15% SSS (Figura 1F). La fracción positiva o espermatozoides apoptóticos unidos a las *beads* es colectada retirando la columna del magneto para luego agregar 500 µl del *buffer* de pegado y con la ayuda de un émbolo se procede a obtener la fracción deseada.

Figura 1. Detalle experimental del uso de las columnas de anexina V.

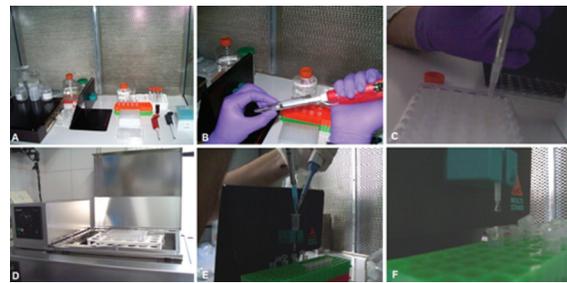
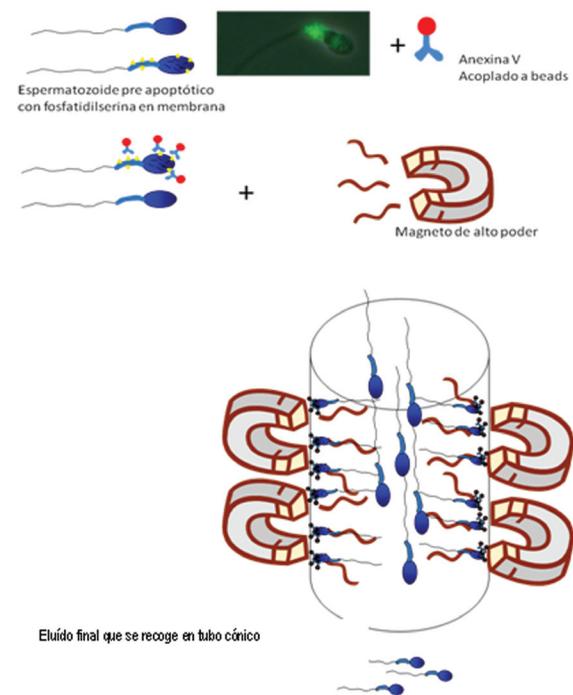


Figura 1-A. La representación esquemática de lo anteriormente explicado es la siguiente:



4. Fijación del material

De cada fracción obtenida se procede a ajustar la concentración hasta un máximo de 5×10^6 espermatozoides/ml, seguidamente se lavan las muestras con PBS 1X (*Irving Scientific*, CA) centrifugando por 5 minutos a 300 g. El *pellet* es resuspendido en PBS-Formaldehído al 2% (*Sigma F-1635*) y fijado al menos por 45 minutos a temperatura ambiente.

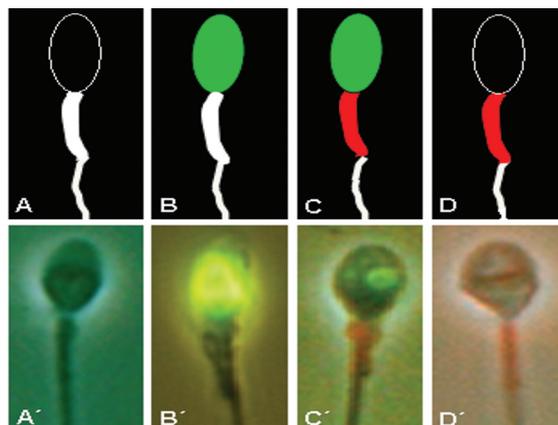
5.- Evaluación de la fragmentación del ADN y caspasa-3 activa

Luego de la fijación se lava cada fracción con PBS 1X para retirar el exceso de fijador y de cada una se colocan 25 μ l sobre un *slide* "multipozo" (*Cell Point Scientific, Inc.*), que se deja reposar a temperatura ambiente por 45 minutos. Luego se retira el exceso de PBS 1X y se procede a permeabilizar la muestra agregando metanol frío (*Merck 1.06009.1011*) por 2-3 minutos, seguidamente se lava cuidadosamente con PBS 1X procurando retirar muy bien el exceso de metanol. Sobre cada pozo se colocan 25 μ l de una solución del anticuerpo primario anti-caspasa-3 activa (*Cell Signaling Technology*) en *buffer* de bloqueo (BSA 0,3%, SFB 1%, gentamicina 0,5%, azida sódica 2mM en PBS 1X) y se deja a 4°C por toda la noche. Al día siguiente se lava 3 veces por 5 minutos en PBS 1X y se agregan 25 μ l de la solución del anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 anti-conejo (*Molecular Probes*). La incubación se realiza por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente se lava con PBS 1X y se procede a incubar con 25 μ l de la solución de TUNEL (*Roche*) (22,5 μ l de solución #2 - *label* + 2,5 μ l de la solución #1 - enzima) por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Al finalizar este tiempo, se lava 3 veces con PBS 1X y se monta con *Vectashield H-1000* (*Vector Laboratories Inc., CA*) para ser evaluado por microscopía de epifluorescencia. Se observan aproximadamente 500 espermatozoides de cada fracción. Los patrones observados son los representados en la Figura 2. Los paneles A-D son representaciones esquemáticas de los diferentes patrones estudiados y muestra-

dos en A'-D' (Figura 2) A-A' espermatozoide negativo, B-B' espermatozoide TUNEL positivo, C-C' espermatozoide TUNEL positivo y caspasa-3 activa positivo y D-D' espermatozoide de caspasa-3 activa positivo.

Este procedimiento cuenta con los siguientes controles: a) positivo en donde se incubaba la muestra por 20 minutos a temperatura ambiente con DNasa I (*Sigma DN25*) 1U/ml; y b) negativo en el cual hay ausencia del anticuerpo primario anticaspasa-3 activa y de la solución #1 del TUNEL.

Figura 2. Patrones observados de TUNEL y Caspasa-3 activa



6.- Concentración, movilidad y sobrevida

De cada fracción obtenida se registran los valores correspondientes a: a) concentración y movilidad evaluada en cámara Makler (*Sefi Medical Instruments*), y b) sobrevida observada empleando el test de eosina (OMS, 1999).

Resultados

Pasaremos a revisar en detalle los resultados obtenidos con esta novedosa técnica.

La Tabla 1 representa los resultados generales de los parámetros evaluados (porcentaje de fragmentación del ADN y porcentaje de caspasa-3 activa, movilidad y sobrevida) en las diferentes fracciones estudiadas dentro de cada ensayo de columnas por paciente, es decir, la

que corresponde a la fracción inicial (*Swim-up* o Gradiente), seguidamente la que corresponde a la fracción negativa (eluido o filtrado de la columna) y finalmente la fracción positiva (adherida a la columna). La puesta a punto de las distintas condiciones de trabajo (temperatura, tiempos, etc) nos arrojó valores informativos en 15 de las 18 muestras que inicialmente iniciaron el estudio. De manera satisfactoria todas las muestras estudiadas vieron reducidos sus niveles de fragmentación del ADN y caspasa-3 clivada de manera significativa. Incluso las muestras normales inicialmente (Grupo IV) redujeron los índices de fragmentación del ADN de los espermatozoides. En todos los casos la movilidad y sobrevida no varió significativamente.

En la Tabla 2 se representan los resultados de fragmentación del ADN de cada fracción dentro de los diferentes grupos estudiados. Así, por ejemplo, en el Grupo I (considerado el más patológico), cuya característica es presentar inmovilidad total ligado a un índice de fragmentación $\geq 20\%$, la fragmentación del ADN inicial (35,5%) disminuyó significativamente a un valor promedio en la fracción negativa del 17%, siendo este valor considerado dentro de los valores normales (Sergerie y col, 2005). Como era de esperar, la fracción positiva presentó altos niveles de fragmentación del ADN (82,5%). La significancia estadística entre las tres fracciones de este grupo fue $p=0,03$. En el Grupo II, por su parte, cuya característica es presentar niveles de fragmentación $>20\%$ y con distintos niveles de movilidad, se pudo evidenciar una disminución de la fragmentación de ADN desde un 25,6% en la fracción inicial hasta un 8,50% en la fracción negativa. El promedio de niveles de fragmentación en la fracción positiva fue de 51,63%. La significancia estadística entre las tres fracciones de este grupo fue de $p=0,001$. En el Grupo III, que se caracteriza por presentar niveles de fragmentación del ADN $<20\%$ y una movilidad normal, se pudo apreciar un similar comportamiento como en los grupos anteriores, en donde el promedio de la fragmentación inicial (13,6%)

disminuyó hasta un 6,33%, la fracción positiva presentó niveles de fragmentación de ADN altos (35,33%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,026$). Finalmente, en el Grupo IV, en donde el promedio de índice de fragmentación de ADN está dentro de valores mínimos (6,50%), éstos pudieron ser disminuidos aún a niveles más bajos en la fracción negativa (3%), mientras que la fracción positiva presentó niveles de fragmentación del 32%, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,003$).

Respecto a los niveles de caspasa-3 activa podemos decir que en todos los grupos evaluados se logró disminuir los niveles de la misma activa, pero sólo en el Grupo II se alcanzaron niveles de significancia estadística ($p=0,009$). Al respecto, ver Tabla 3.

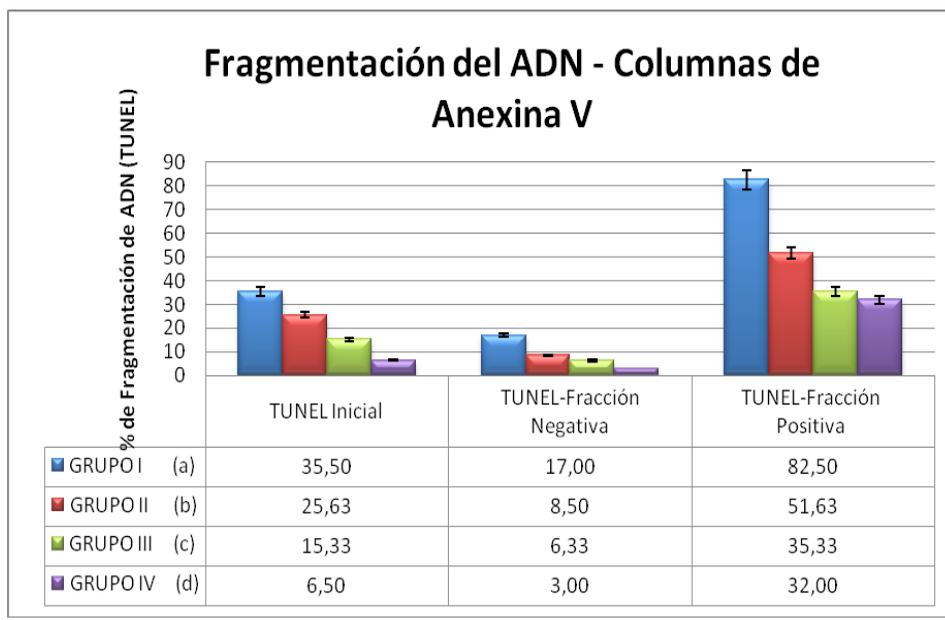
En las Tablas 4 y 5 se representan los promedios en relación a las diferencias entre la movilidad y sobrevida alcanzada entre los grupos estudiados. En el Grupo I, las muestras estudiadas poseían inmovilidad total y altos niveles de muerte celular. Mientras que la movilidad se mantuvo en los niveles iniciales pre y post-pasaje por columnas de anexina V, la sobrevida se logró incrementar de un 22% a un 37%, logrando así enriquecer muestras muy patológicas con espermatozoides vivos y no apoptóticos. En el Grupo II la movilidad disminuyó de un 66,88% a un 44,13%, valor que es aceptable para la realización de ICSI. Aunque los promedios de sobrevida no mostraron ser estadísticamente significativos en este grupo, se aumentó de un 68,50% hasta un 77,13%, enriqueciendo así la muestra en mayor cantidad de espermatozoides vivos. En el Grupo III la movilidad disminuyó de un 49% a un 31,6% y la sobrevida aumentó ligeramente de un 82,5% hasta un 87,5%, siendo estas diferencias no significativas. De igual manera se manifestaron los resultados en el Grupo IV en donde la movilidad disminuyó de un 50% a un 22,5% y la sobrevida de un 89% a un 85%.

Tabla 1. Resultados generales de pacientes que realizaron el ensayo de columnas de anexina V

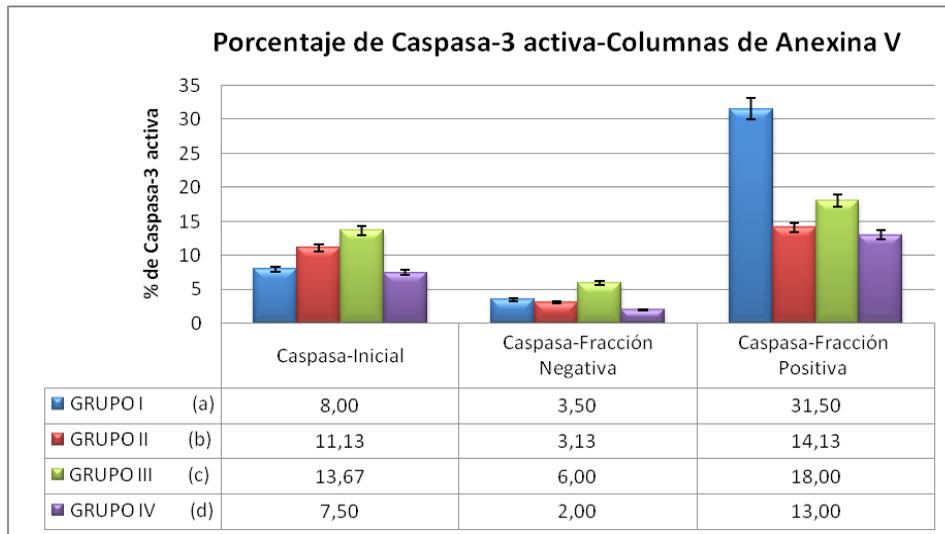
Pac.	FRACCIÓN INICIAL					FRACCIÓN NEGATIVA					FRACCIÓN POSITIVA				GRUPOS
	CONC.	MOVIL.	VIAB.	TUNEL	CASPASA	CONC.	MOVIL.	VIAB.	TUNEL	CASPASA	CONC.	MOVIL.	TUNEL	CASPASA	
1	8	0%	6%	50%	12%	2	0%	40%	22%	5%	3	0%	90%	50%	GRUPO I
2	3	0%	38%	21%	4%	1,2	0%	34%	12%	2%	0,35	0%	75%	13%	GRUPO I
3	21	99%	97%	30%	6%	13	55%	95%	0,8%	2,1%	1	0%	29%	25%	GRUPO II
4	40	98%	98%	25%	9%	20	40%	89%	4,2%	4%	1	0%	30%	18%	GRUPO II
5	10	82%	72%	28%	24%	1,7	100%	100%	12%	7%	0,3	0%	42%	26%	GRUPO II
6	20	90%	86%	25%	2%	5	100%	100%	5%	1%	0,2	0%	29%	5%	GRUPO II
7	1	70%	74%	22%	10%	0,15	30%	90%	7%	2%	0,2	0%	54%	9%	GRUPO II
8	8	70%	70%	24%	5%	5,5	10%	76%	12%	2%	0,2	0%	80%	10%	GRUPO II
9	10	10%	28%	30%	10%	2,8	15%	32%	15%	2%	0,5	0%	77%	10%	GRUPO II
10	0,7	8%	23%	21%	23%	0,3	3%	35%	12%	5%	0,5	0%	72%	10%	GRUPO II
11	5	2%	75%	17%	14%	3,5	15%	85%	10%	11%	0,3	0%	41%	12%	GRUPO III
12	20	80%	77%	14%	14%	2,3	60%	90%	8%	6%	0,3	0%	40%	22%	GRUPO III
13	19	65%	95%	15%	13%	5,8	20%	85%	1%	0,80%	0,5	0%	25%	20%	GRUPO III
14	2	21%	83%	9%	12%	1,5	25%	90%	5%	4%	0,15	0%	32%	18%	GRUPO IV
15	15	79%	95%	4%	3%	11	20%	80%	0,60%	0,30%	1	0%	32%	8%	GRUPO IV

La concentración se define por 106/ml. La viabilidad se define a partir de los valores del test de eosina. La palabra "TUNEL" define el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN en cada muestra medida por esa técnica acoplada a fluorescencia. La palabra "CASPASA" define el porcentaje de espermatozoides con presencia de la proteína caspasa-3 en su forma activa (clivada) en cada muestra medida por inmunocitoquímica y fluorescencia.

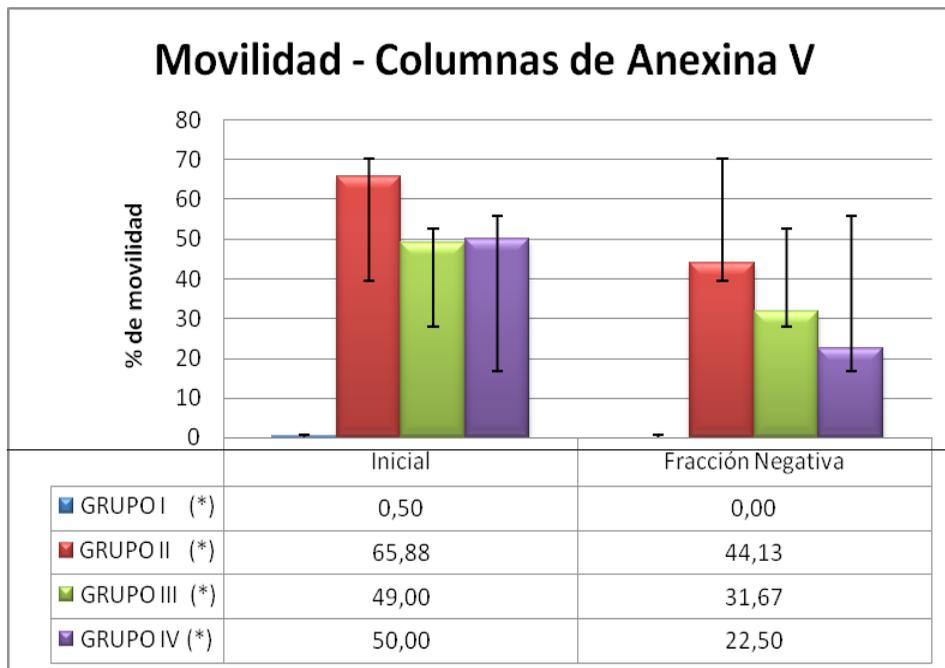
Tabla 2. Niveles de fragmentación de ADN en las diferentes fracciones separadas por las columnas de anexina V



(a) p=0,03; (b) p=0,001; (c) p=0,026; (d) p=0,003. NS: no significativo

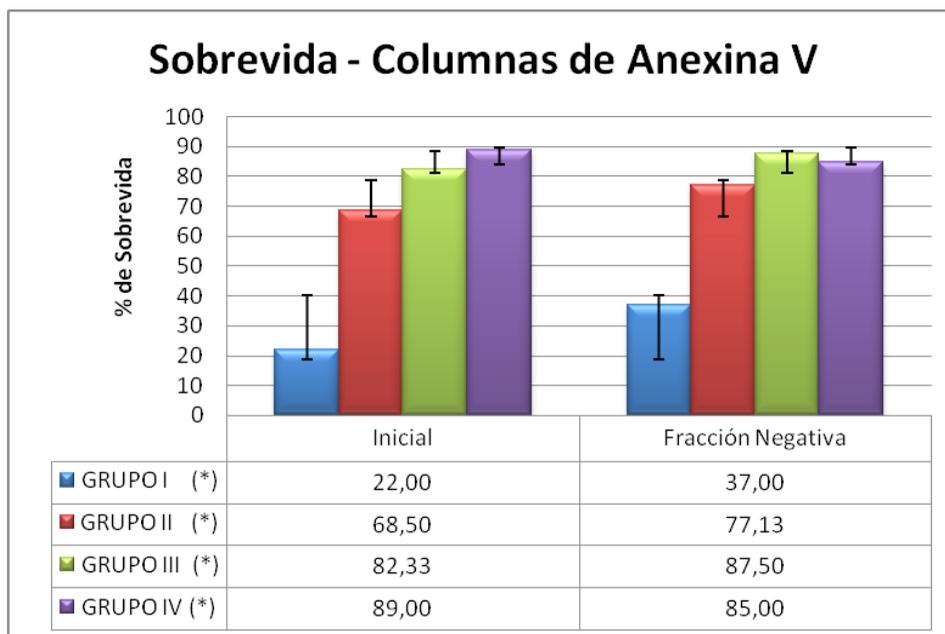
Tabla 3. Niveles de caspasa-3 activa en las diferentes fracciones separadas por las columnas de anexina V

(a)(c)(d) p=NS; (b) p=0,009. NS: no significativo

Tabla 4. Niveles de movilidad en las diferentes fracciones separadas por las columnas de anexina V

(*) p = NS. NS: no significativo

Tabla 5. Niveles de sobrevida en las diferentes fracciones separadas por las columnas de anexina V



(*) p= NS. NS: no significativo DISCUSIÓN

Discusión

El planteo original del presente trabajo se basó en poder dar respuesta a tres preguntas y mostrar que el uso de una novedosa técnica como la de columnas de anexina V podía servir como método de remoción de espermatozoides apoptóticos de una muestra afectada. Planteadas las preguntas, se exponen a continuación las respuestas obtenidas y su validación con hallazgos publicados por otros autores.

1. ¿Podemos mejorar los valores de apoptosis y fragmentación del ADN espermático de las muestras afectadas? Es decir, ¿podemos mimetizar los valores obtenidos por los grupos de trabajo internacionales y de esta manera validar la técnica?

Nuestros resultados preliminares indican que la técnica es eficaz en la reducción del número de espermatozoides pre-apoptóticos y fragmentados. Desde hace unos años atrás, Grunewald y col, 2001; Glander y col, 2002; Paasch y col, 2003, postularon que el método de columnas de anexina V es realizable y seguro y que puede ser usado para proveer fracciones de espermatozoides de alta calidad. Said y col (2005) estudiaron 15 muestras

de semen de hombres normales y compararon diferentes métodos de separación de espermatozoides no apoptóticos. Se usaron gradientes y lavados acoplados a columnas de anexina V y se midieron los niveles de externalización de fosfatidilserina, potencial de membrana plasmática y niveles de caspasa-3 activa en las distintas poblaciones estudiadas (fracción inicial, fracción negativa y fracción positiva). Los autores mostraron mejorías en los niveles de movilidad, sobrevida, potencial de membrana mitocondrial y niveles de caspasa-3 activa luego del uso de columnas de anexina V y gradientes. Basándose en esa experiencia preliminar, el mismo grupo de trabajo (Said y col, 2006) utilizó 35 muestras de donantes normales, y luego del pasaje de las muestras por columnas de anexina V lograron disminuir los niveles de caspasa 3 activa a aproximadamente la mitad de los iniciales y el potencial de membrana mitocondrial aumentó un 10% en promedio. En el mismo estudio la fragmentación del ADN medido por la técnica de TUNEL pasa de un promedio \pm desvío estándar de $14,4 \pm 13,2\%$ a $9,7 \pm 10,6\%$ en la fracción anexina V negativa (eluido). Los autores plantean que se necesitan experimentos con pacientes infértiles

y con modelos animales que evalúen la viabilidad y genética de los embriones antes de que la técnica se pueda usar en la clínica.

En resumen, los datos mostrados en la literatura concuerdan con los obtenidos en nuestra experiencia y nos indican que la técnica es repetible con eficacia en nuestras manos.

2. *¿Cómo funcionan las columnas de anexinas V con distintas muestras de semen?*

Se plantea esta pregunta para dilucidar si las muestras de hombres normales se comportan de igual manera que las muestras de pacientes infértiles con distintos parámetros del semen alterado. En nuestra experiencia los distintos parámetros seminales no parecen afectar la eficacia del ensayo.

Recientemente, Grunewald y col, 2008 utilizaron 21 donantes infértiles y realizaron el ensayo de columnas de anexinas V utilizando la metodología usada por Said y col, 2006. En este estudio la movilidad decrece en aproximadamente un 20%, los valores de caspasa-3 activa decrecen a aproximadamente la mitad (promedio \pm desvío estándar inicial: $43,5 \pm 13,8\%$ y fracción anexina V negativa: $26,8 \pm 12,3\%$) y el potencial de membrana mitocondrial se incrementa de manera significativa en la fracción anexina V negativa. Los autores señalan que los beneficios de usar columnas de anexinas V en pacientes con altos niveles de apoptosis (infértiles) son evidentes. Esto da soporte a la idea del impacto negativo que tiene la apoptosis en el potencial de fecundación.

Said y col, 2006, intentan por primera vez el uso de los espermatozoides de la fracción anexina V negativa para la inyección intracitoplásmica de oocitos de hámster (ICSI) y se testea el grado de descondensación de la cromatina. Los autores encuentran un aumento de aproximadamente un 10% en el número de oocitos que muestran cromatina del espermatozoide descondensada, pero esta diferencia no es significativa con respecto a controles. Las muestras de pacientes infértiles contienen altos números de espermatozoides apoptóticos que correlacionan con bajos niveles de descondensación de la cromatina luego de ICSI en hámsters. Consecuentemente, la inclusión de la separación de espermatozoides usando columnas de anexina

V podría mejorar los resultados de ICSI.

En resumen, en nuestra experiencia hasta es posible “mejorar” muestras normales y de esta manera “enriquecer” las muestras testeadas con espermatozoides no apoptóticos. Las muestras de pacientes infértiles deben ser consideradas en el contexto de la clínica que cada paciente presenta. En cada caso es importante diagnosticar la patología espermática subyacente incluyendo los estudios de fragmentación del ADN y marcadores de apoptosis, junto con los trastornos andrológicos presentes que afecten la calidad espermática (varicocele, criptorquidia, infecciones, etc) para de esa manera poder tomar medidas terapéuticas adecuadas.

3. *¿Se afecta la movilidad final? ¿Se afecta la sobrevida de la muestra?*

En nuestro estudio la movilidad decrece aproximadamente un 20% luego el pasaje por columnas de anexinas V (Tabla 4). En la mayoría de las muestras estudiadas la movilidad es afectada mayormente en su naturaleza, es decir, hay menor número de espermatozoides progresivos rápidos para pasar a tener mayor cantidad de progresivos lentos. En un futuro el uso de estos espermatozoides para técnicas de reproducción asistida debiera ser considerado en el marco de un ICSI.

Aunque no de manera estadísticamente significativa (Tabla 5), la sobrevida se incrementa (mayor número de espermatozoides vivos finales) luego del pasaje por columnas de anexina V. Como ha sido mencionado anteriormente, estos datos coinciden con los reportados en la literatura.

El uso de columnas de anexina V es muy efectivo en la remoción de espermatozoides apoptóticos. La población recuperada muestra niveles normales de fragmentación del ADN y caspasa-3 activa, mientras que la movilidad y sobrevida no son afectadas de manera significativa en todos los grupos estudiados. Este novedoso método claramente muestra la ventaja de integrar la filtración molecular en la separación de espermatozoides apoptóticos. El uso de una población de espermatozoides no apoptóticos y con membranas intactas podría optimizar los resultados de técnicas de reproducción asistida y ser una alternativa terapéutica efectiva para aquellos casos que así lo requieran.

Referencias

- ASRM Assisted reproductive technology in the United States: 2000 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril* 2004;81: 1207-1220.
- Avendaño C, Franchi A, Taylor S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril* 2008; en prensa.
- Boe-Hansen G, Fedder J, Ersboll A and Christensen P The sperm chromatin structure assay a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Human Reprod.* 2006;6: 1576-1582.
- Bolle P, Evandri MG and Saso L The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. *Contraception* 2002; 65:313-315.
- Chemes HE, Rawe VY. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003;5:405-428.
- Chemes HE, Rawe VY. Sperm pathology: pathogenic mechanisms and fertility potential in assisted reproduction. Capítulo 6. Male infertility: Diagnosis and Treatment edited by T. Kruger and S. Oehninger. *Informa Healthcare* 2006; 85-103.
- Gerris J and Van Royen E Avoiding multiple pregnancies in ART. A plea for single embryo transfer. *Hum Reprod* 2000; 15: 1884-1888.
- Glander HJ and Schaller J Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 1999;5:109-115.
- Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, et al. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2006; 3:349-353.
- Greco E, Romano S, Iacobelli M, et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Human Reprod* 2005;20:2590-2594.
- Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005;20:226-230.
- Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, et al. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2001;2:127-133.
- 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(2):572-577.
- Kruger TF, et al. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 1:112-117.
- Martin-Du Pan RC and Sakkas D Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Are anti-oxidants useful in the treatment of male infertility? *Hum Reprod* 1998;13:2984-2985.
- Miltenyi S, Muller W, Weichel W, et al. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; 11:231-238.
- Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, et al. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2003; 7:469-476.
- Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E, et al. Semen quality and intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online* 2003;7:485-492.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Manual de Laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical Segunda Edición. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana (1999).
- Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, et al. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 2003;24:246-252.
- Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, et al. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod* 2004;71:1828-1837.
- Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, et al. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2004;81:802-809.
- Palermo G, Cohen J, Alikani M, et al. Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev* 1995;2:211-217.
- Ramos L, De Boer P, Meuleman E, et al. Chromatin condensation and DNA damage of human epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Reprod Biomed Online* 2004;4:392-397.
- Said T, Agarwal A, Grunewald S, et al. Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod Biomed Online* 2006;3: 336-339.
- Said T, Agarwal A, Grunewald S, et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 2006;74:530-537.
- Said T, Agarwal A, Zborowski M, et al. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 2008;2:134-142.
- Said T, Grunewald S, Paasch U, et al. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques *Reprod Biomed Online* 2005;6:740-746.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, et al. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005; 20(12):3446-3451.
- Steptoe PC, Edawrds RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978;312(8085):366.
- Weng SL, Taylor SL, Morshedi M et al Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002;8:984-991.