

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
 - a. Título.
 - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
 - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
 - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
 - e. Introducción.
 - f. Material y métodos.
 - g. Resultados.
 - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
 7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
 8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
 - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.
- En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaría de SAMeR: info@samer.org.ar

Recién nacidos por técnicas de reproducción asistida con columnas de anexina

María Florencia Ugozzoli Llugdar, Cristian Álvarez Sedo, Andrea Coscia, Sergio Papier, Susana Kopelman

Cegyr, Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2014;29:11-21

Resumen

Objetivo. Comparar los datos de los recién nacidos (RN) de parejas que realizaron tratamientos de reproducción asistida (TRA) convencional vs TRA con MACS (Magnetic Activated Cell Sorting). **Materiales y métodos.** El presente estudio es un análisis retrospectivo y comparativo. Se consideraron 100 ciclos de pacientes que realizaron TRA (2009–2012) y que tuvieron un RN luego de usar MACS (Grupo I). Se consideraron sólo transferencias de embriones en fresco y utilización de semen homólogo fresco. La indicación del uso de MACS fue: fragmentación del ADN (TUNEL) >20% y/o Caspasa-3-activa (C3A) >11%. Se evaluaron en ciclos con oocitos propios y donados las siguientes variables: peso, sexo, edad gestacional, malformaciones congénitas, mortalidad perinatal, N° fetos, complicaciones obstétricas y fetales. Se consideraron grupos comparativos: RN luego de ICSI con factor masculino leve (Grupo II) y factor masculino severo con TUNEL y/o C3A normal (Grupo III), ambos grupos sin MACS. **Resultados.** Los RN con MACS, Grupo II y Grupo III en ciclos con oocitos propios fueron 67 (47 únicos y 20

dobles), 37 (23 únicos y 14 dobles) y 38 (23 únicos y 15 dobles), respectivamente. Los RN con MACS, Grupo II y Grupo III en ciclos oocitos donados fueron 50 (36 únicos y 14 dobles), 59 (33 únicos y 26 dobles), y 22 (14 únicos y 8 dobles), respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables luego de ser comparadas con los grupos II y III. **Conclusiones.** Los RN luego del uso de MACS presentan similares características a los RN luego de ICSI convencional.

Palabras claves. Recién nacidos y columnas de anexina.

Summary

Objective. To compare newborn (NB) data of couples underwent conventional assisted reproductive technology (ART), vs. couples under ART with MACS (Magnetic Activated Cell Sorting). **Material and methods.** This is retrospective and comparative study. A hundred patients who performed ART cycles (2009-2012) with a NB achieved with MACS were considered (Group I). It was included cycles where fresh embryo transfer and fresh homologous semen were performed. Indications for MACS treatment were: sperm DNA fragmenta-

Correspondencia: Cegyr
Viamonte 1432, Buenos Aires, Argentina. Tel.: (011) 4372-8289
E-mail: fugozzoli@cegryr.com

tion (TUNEL) >20% and/or cleaved caspase 3 (C3A)>11%. It was included cycles with donated and own oocytes. Variables such as: weight, sex, gestational age, congenital malformations, N° fetus, perinatal mortality and obstetrics and fetal complications were included. Two comparative groups were considered: NB after ICSI with mild male factor (Group II) and severe male factor with normal TUNEL and C3A (Group III), both groups without MACS. Results. NB with MACS, Group II and III in cycles using own oocytes, were 67 (47 single and 20 double), 37 (23 single and 14 double) and 38 (23 single and 15 double), respectively. NB with MACS, Group II and III using donated oocytes were 50 (36 single and 14 double), 59 (33 single and 26 double) and 22 (14 single and 8 double), respectively. No significant differences were found between groups.

Conclusions. NB after MACS has similar characteristics in comparison with conventional ICSI.

Key words. *Newborn and Magnetic Activated Cell Sorting.*

Introducción

En la actualidad se estima que más de 100.000 niños nacen anualmente en el mundo con la ayuda de cualquiera de las técnicas vigentes de reproducción asistida.¹ El incremento de las técnicas y de su efectividad ha ido asociado a la introducción de la criopreservación embrionaria y a la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI). En EE.UU. (SART) se registraron un total de 154.412 tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad en el año 2011, el 99% de los mismos correspondían a FIV-ICSI, siendo la tasa promedio de recién nacido vivo de 36,0%. En ovodonación se realizaron 9.332 transferencias embrionarias en fresco, con una tasa de recién nacido vivo de 54,9%.

Las TRA se han transformado en el tratamiento de elección en casos de infertilidad femenina y masculina, sin embargo, las tasas de embarazo permanecen en niveles subóptimos en los casos de factor masculino severos.² 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 daño en el ADN o de muerte celular programada (apoptosis) que pueden ser en gran medida responsables de una baja tasa de fecundación e implantación.^{3,4} La integridad del ADN del espermatozoide ha demostrado que influye tanto en las tasas de fertilización,⁵ en la implantación y desarrollo del embarazo.⁶

Con el propósito de seleccionar mejores poblaciones espermáticas, se han desarrollado nuevas terapéuticas no invasivas para reducir los niveles de apoptosis espermática a través de la selección por microesferas magnéticas o columnas de anexina (MACS, Magnetic Activated Cell Sorting).^{7,8} Esta es una técnica de selección espermática que utiliza el agregado de esferas supramagnéticas biodegradables conjugadas con anexina V para separar poblaciones espermáticas apoptóticas que presentan la externalización de fosfatidilserina en su membrana con alta afinidad a la anexina V. Esta técnica permite separar la población afectada de las no apoptóticas al ser aplicadas sobre una columna expuesta a un campo magnético.⁹ De esta manera se logra la selección de espermatozoides no apoptóticos y se enriquece la muestra con espermatozoides que podrían llegar a ser usados en TRA.

A pesar de la aplicación extensa de estos procedimientos, el pronóstico de los niños ha tenido menor relevancia que el éxito de las técnicas, tanto en porcentaje de gestaciones conseguidas como en tasa de recién nacidos vivos. La primera consecuencia de las TRA ha sido el incremento de la gestación múltiple; en la actualidad se estima que más del 70% de los embarazos gemelares y el 99% de las gestaciones de mayor orden son resultado de los tratamientos de infertilidad. Los principales riesgos que afectan al feto y a los recién nacidos producto de embarazos múltiples son la prematuridad y la cigosidad.

Hasta la fecha sólo se han reportado dos trabajos de embarazo evolutivo tras realizar TRA con separación espermática con columnas de anexina.^{10,11} Esta técnica se realiza mayoritariamente en Latinoamérica, y en menor proporción en España, Turquía, Francia, Canadá, China, etc. Desde el inicio la utilización de MACS en TRA se han reportado trabajos en cuanto a su efectividad clínica; hasta la fecha no existe ningún reporte de los datos sobre los recién nacidos. Nuestra institución cuenta con una importante casuística de tratamientos y recién naci-

dos con MACS, por lo que creemos importante la ejecución de este primer reporte.

Finalmente, el objetivo de nuestro estudio es: comparar los datos de los recién nacidos de parejas que realizaron TRA convencional (con factor masculino leve y severo) vs TRA con MACS.

Materiales y métodos

El diseño del presente estudio es de tipo retrospectivo y comparativo. Para lo cual se analizaron 100 ciclos parejas que realizaron TRA en CEGYR (Medicina Reproductiva, Buenos Aires, Argentina) desde enero 2009 hasta marzo 2012, que tuvieron un recién nacido luego de realizar ICSI con MACS (Grupo I). Sólo se consideraron ciclos donde la transferencia embrionaria se realizó en fresco y se empleó semen homólogo fresco.

La indicación del uso de MACS fue por presentar niveles alterados de fragmentación de ADN (TUNEL mayor a 20% y/o Caspasa 3 Activa mayor a 11%) en estudio previo de semen (no mayor a 6 meses).

En los recién nacidos se procedió a evaluar las siguientes variables:

1- Edad gestacional al nacimiento. Se calculó a partir de la fecha de la última menstruación. Se clasificó en: Prematuro (cuando el parto tiene lugar antes de 37 semanas de gestación), A término (de 37 a 42 semanas de gestación) y Pos maduro (nacido después de 42 semanas de gestación).¹²

2- Peso: expresado en gramos.

3- Sexo: femenino o masculino.

4- Número de fetos: embarazo único o múltiple, determinado por ecografía obstétrica realizada el primer trimestre de embarazo.

5- Malformaciones congénitas. Fue definida como el defecto estructural primario de un órgano, parte de él o zonas más extensas del organismo, que resulta de una alteración inherente en el desarrollo y que se hace evidente al examen físico del recién nacido, o posterior al nacimiento, cuando se hace patente el defecto funcional de un órgano interno afectado

anatómicamente. Por su magnitud se distinguen en mayores y menores. Las primeras relativas a los defectos que tienen un compromiso funcional importante para la vida del individuo, por lo que tienen consecuencias médicas o estéticas, requieren de atención temprana, algunas veces de urgencia y, por tanto, tienen también repercusión psicosocial.^{13,14}

6- Complicaciones obstétricas. Las complicaciones obstétricas se refieren a disrupciones y trastornos sufridos durante el embarazo, el parto y el trabajo de parto, así como en el período neonatal inicial. Entre los ejemplos de dichas complicaciones se incluyen la exposición prenatal a drogas, una alimentación materna inadecuada, anomalías físicas menores y complicaciones en el nacimiento. Las complicaciones obstétricas pueden tener efectos de largo plazo en un niño, incluyendo la acentuación de conductas problemáticas.

7- Complicaciones fetales.

8- Mortalidad perinatal: se consideran todas las muertes ocurridas entre la vigesimo octava semana de gestación y el séptimo día de nacimiento.

Con fines de realizar el análisis comparativo se consideraron los siguientes grupos:

Grupo I: pacientes que realizaron MACS.

Grupo II: pacientes que realizaron TRA por factor masculino leve (concentración espermática mayor a 5 millones/ml, índice estricto de morfología mayor de 4%).

Grupo III: pacientes que realizaron TRA por factor masculino severo con niveles de TUNEL y/o Caspasa 3 Activa normal (concentración espermática menor a 5 millones/ml, índice estricto de morfología menor de 4%).

Los Grupos II y III tuvieron características similares. Así, en ciclos de TRA con oocitos propios la causa de la infertilidad solamente fue de tipo masculina y las edades maternas fueron iguales o menores de 38 años con una respuesta folicular mayor a 10 folículos al estímulo durante el tratamiento. En los ciclos de TRA con oocitos donados la causa fue tanto femenina (edad reproductiva

avanzada o falla ovárica prematura) como masculina.

En todos los casos se utilizó semen en fresco y homólogo y las transferencias embrionarias fueron en fresco. En ningún caso realizaron MACS. Fueron analizados 124 ciclos de parejas que realizaron TRA durante el mismo período en nuestra institución.

El número de RN de cada grupo se encuentra detallado en la Tabla 1. El análisis estadístico fue realizado mediante las pruebas de ANOVA y chi-cuadrado según corresponda mediante el uso del programa estadístico *MedCalc* (v12.4).

Resultados

Las edades de las pacientes del Grupo I con oocitos propios estaban comprendidas entre 26 a 43 años y con oocitos donados entre 31-47 años.

Las edades de las pacientes del Grupo II se encontraban entre 26-38 años (oocitos propios) y 29-50 años (oocitos donados). En el Grupo III las edades con oocitos propios se encontraban entre 27-38 años y con oocitos donados entre 36-46 años. No se observaron diferencias significativas en relación a la variabilidad del rango de edad.

En la Tabla 2 se representa el número total de embarazos en los Grupo I, II y III, en donde se detalla el número de fetos (único o múltiple) en cada uno de los grupos. Se obtuvo un promedio de embarazo único en el Grupo I de 82,5% con oocitos propios y 84% con oocitos donados. Todos los embarazos múltiples fueron dobles en este grupo. En el Grupo II el promedio de embarazo único fue de 77% (oocitos propios) y 72% (oocitos donados), de igual manera todos los embarazos múltiples fueron dobles. En el Grupo III el promedio

Tabla 1. Total de recién nacidos únicos y múltiples en cada grupo.

RECIÉN NACIDOS	GRUPO I OOCITOS PROPIOS	GRUPO I OOCITOS DONADOS	GRUPO II OOCITOS PROPIOS	GRUPO II OOCITOS DONADOS	GRUPO III OOCITOS PROPIOS	GRUPO III OOCITOS DONADOS
RN ÚNICO	47	36	23	33	23	14
RN MÚLTIPLE	20	14	14	26	15	8
RN TOTAL	67	50	37	59	38	22

Tabla 2. Número de embarazos únicos y múltiples en cada grupo.

EMBARAZOS	GRUPO I OOCITOS PROPIOS	GRUPO I OOCITOS DONADOS	GRUPO II OOCITOS PROPIOS	GRUPO II OOCITOS DONADOS	GRUPO III OOCITOS PROPIOS	GRUPO III OOCITOS DONADOS
EMB ÚNICOS	47	36	23	33	23	14
EMB MÚLTIPLES	10	7	7	13	7	4
EMB TOTALES	57	43	30	46	30	18

de embarazo único fue de 77% (oocitos propios) y 78% (oocitos donados), en este grupo uno de los embarazos múltiples fue triple (oocitos propios).

En la Tabla 3 podemos observar la distribución de los pesos expresado en gramos de los recién nacidos. El Grupo I con oocitos propios tuvo un promedio de 72% de recién nacido con peso normal (entre 2500 y 3999 gramos), el 23% de recién nacido con bajo peso (entre 1.000 y 2.499

gramos) y un 5% de recién nacido con alto peso superior a 4.000 gramos. En el mismo grupo con oocitos donados se obtuvo un promedio de 78% de recién nacido con peso normal (entre 2.500 y 3.999 gramos), el 18% de recién nacido con bajo peso (entre 1.000 y 2.499 gramos) y un 4% de recién nacido con alto peso superior a 4.000 gramos. En las Tablas 4 y 5, al comparar el Grupo I tanto con oocitos propios como con oocitos do-

Tabla 3. Pesos de los recién nacidos expresados en gramos.

PESO (g)	GRUPO I	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO III
	OOCITOS PROPIOS	OOCITOS DONADOS	OOCITOS PROPIOS	OOCITOS DONADOS	OOCITOS PROPIOS	OOCITOS DONADOS
1.000-1.249	3	0	0	0	0	0
1.250-2.499	13	9	12	19	10	8
2.500-2.999	24	17	6	17	7	4
3.000-3.999	24	22	19	23	21	10
>4.000	3	2	0	0	0	0

Tabla 4. No se encontraron diferencias significativas al comparar los pesos de los recién nacidos entre el Grupo I y el Grupo II

PESO AL NACER OOCITOS PROPIOS	GRUPO I	GRUPO II	P
BAJO PESO (1.000-2.499)	16	12	NS
PESO NORMAL (2.500-3.999)	48	25	NS
ALTO PESO (+4.000)	3	0	NS

PESO AL NACER OOCITOS DONADOS	GRUPO I	GRUPO II	P
BAJO PESO (1.000-2.499)	9	19	NS
PESO NORMAL (2.500-3.999)	39	40	NS
ALTO PESO (+4.000)	2	0	NS

Tabla 5. No se encontraron diferencias significativas al comparar los pesos de los recién nacidos entre el Grupo I y el Grupo III.

PESO AL NACER OOCITOS PROPIOS	GRUPO I	GRUPO III	P
BAJO PESO (1.000-2.499)	16	10	NS
PESO NORMAL (2.500-3.999)	48	28	NS
ALTO PESO (+4.000)	3	0	NS

PESO AL NACER OOCITOS DONADOS	GRUPO I	GRUPO III	P
BAJO PESO (1.000-2.499)	9	8	NS
PESO NORMAL (2.500-3.999)	39	14	NS
ALTO PESO (+4.000)	2	0	NS

nados versus los Grupo II y Grupo III no se encontraron diferencias significativas con respecto al peso de los recién nacidos.

La Tabla 6 representa la distribución de los recién nacidos de los diferentes grupos y la edad gestacional al nacer. En nuestro grupo de estudio

se encontró un promedio de 19% de prematuros, de los cuales el 12% correspondían a embarazos dobles. El Grupo I con oocitos propios tuvo un promedio de edad gestacional de $37,2 \pm 2,2$ semanas, dentro de este grupo hubo 14 recién nacidos prematuros con un promedio de prematurez de

Tabla 6. Número de recién nacidos prematuros, a término y postérmino en cada uno de los grupos.

EDAD GESTACIONAL	GRUPO I	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO III
	OOCITOS PROPIOS	OOCITOS DONADOS	OOCITOS PROPIOS	OOCITOS DONADOS	OOCITOS PROPIOS	OOCITOS DONADOS
PREMATURO	14*	5*	7**	12**	8***	6***
TÉRMINO	43	38	23	34	22	12
POSTÉRMINO	0	0	0	0	0	0

* De los 19 prematuros 12 corresponden a EMB dobles.

** De los 19 prematuros 14 corresponden a EMB dobles.

*** De los 16 prematuros 9 corresponden a EMB múltiples.

Tabla 7. No se encontraron diferencias significativas al comparar la edad gestacional de los recién nacidos entre el Grupo I y el Grupo II.

EDAD GESTACIONAL OOCITOS PROPIOS	GRUPO I	GRUPO II	P
PREMATURO (<37 sem)	14	7	NS
TÉRMINO (37-42 sem)	43	23	NS
POSTÉRMINO (>42 sem)	0	0	NS
EDAD GESTACIONAL OOCITOS DONADOS	GRUPO I	GRUPO II	P
PREMATURO (<37 sem)	5	12	NS
TÉRMINO (37-42 sem)	38	34	NS
POSTÉRMINO (>42 sem)	0	0	NS

Tabla 8. No se encontraron diferencias significativas al comparar la edad gestacional de los recién nacidos entre el Grupo I y el Grupo III.

EDAD GESTACIONAL OOCITOS PROPIOS	GRUPO I	GRUPO III	P
PREMATURO (<37 sem)	14	8	NS
TÉRMINO (37-42 sem)	43	22	NS
POSTÉRMINO (>42 sem)	0	0	NS
EDAD GESTACIONAL OOCITOS DONADOS	GRUPO I	GRUPO III	P
PREMATURO (<37 sem)	5	6	NS
TÉRMINO (37-42 sem)	38	12	NS
POSTÉRMINO (>42 sem)	0	0	NS

34,0 ± 2,2 semanas. El Grupo I con oocitos donados tuvo un promedio de edad gestacional de 38,0 ± 1,2 semanas, dentro de este grupo hubo 5 recién nacidos prematuros con un promedio de prematuridad de 35,4 ± 1,2 semanas. De igual manera, en el Grupo II con oocitos propios tuvo un promedio de edad gestacional de 37,5 ± 2,0 semanas, dentro de este grupo hubo 7 recién nacidos prematuros con un promedio de prematuridad de 34,3 ± 2,0 semanas. En el mismo grupo con oocitos donados tuvo un promedio de edad gestacional de 38 ± 2 semanas, dentro de este grupo hubo 12 recién nacidos prematuros con un promedio de prematuridad de 35,6 ± 2 semanas. En el Grupo III con oocitos propios tuvo un promedio de edad gestacional de 37,6 ± 2,0 semanas, dentro de este grupo hubo 8 recién nacidos prematuros con un promedio de prematuridad de 35,0 ± 2 semanas. En el mismo grupo con oocitos donados tuvo un promedio de edad gestacional de 37,3 ± 2 semanas, dentro de este grupo hubo 6 recién nacidos prematuros con un promedio de prematuridad de 35,5 ± 2 semanas.

Las Tablas 7 y 8 demuestran que al comparar el grupo de estudio con los Grupos II y III no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a la edad gestacional al nacer de los recién nacidos en estudio. Las Tablas 9 y 10 muestran la distribución de los eventos relacionados al

Tabla 10. No hubo diferencias significativas al comparar internación neonatal, mortalidad perinatal, malformaciones congénitas y el sexo de los recién nacidos en los diferentes grupos.

	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
INTERNACIÓN NEO	11	15*	4*
MORTALIDAD PERINATAL	0	0*	0*
MALFORMACIONES	1	1*	1*
MASCULINO	60	37*	32*
FEMENINO	57	49*	28*

*P: NS

número de internaciones neonatales, número de malformaciones, número de muertes neonatales y los sexos de los recién nacidos, tanto en el grupo de estudio como en los dos grupos. No se encontraron diferencias significativas al compararlos. En el Grupo I hubo un recién nacido con síndrome de Down en una mujer de 37 años que realizó TRA con oocitos propios. En el Grupo II hubo un recién nacido con hipoplasia pulmonar izquierda en una mujer que realizó TRA con oo-

Tabla 9. Número de recién nacidos que necesitaron internación en neonatología, que tuvieron malformaciones congénitas y muertes perinatales. También se evaluó el número de recién nacidos de sexo femenino y masculino en cada grupo.

	GRUPO I OOCITOS PROPIOS	GRUPO I OOCITOS DONADOS	GRUPO II OOCITOS PROPIOS	GRUPO II OOCITOS DONADOS	GRUPO III OOCITOS PROPIOS	GRUPO III OOCITOS DONADOS
INTERNACIÓN NEO	10*	1*	6**	9**	2***	2***
MORTALIDAD PERINATAL	0	0	0	0	0	0
MALFORMACIONES	1	0	0	1	0	1
MASCULINO	34	26	19	28	23	9
FEMENINO	33	24	18	31	15	13

* De las 11 internaciones 7 corresponden a EMB dobles.

** De las 15 internaciones 10 corresponden a EMB dobles.

*** De las 4 internaciones 3 corresponden a EMB múltiples.

citados donados y en el Grupo III hubo un recién nacido con hipoplasia craneal en una mujer que realizó TRA con oocitos donados. No hubo ninguna muerte neonatal en ninguno de los grupos. El 90% de las complicaciones neonatales fue por síndrome de dificultad respiratoria, el resto fue por hiperbilirrubinemia y dificultad en la succión.

Discusión

Desde el año 1992, en que Palermo y cols publicaron los primeros embarazos obtenidos tras ICSI, este procedimiento se ha convertido en una técnica de rutina en los laboratorios de fecundación *in vitro* (FIV) de todo el mundo. Si en un principio la práctica del ICSI se limitó a casos de infertilidad masculina severa, con el paso del tiempo las indicaciones se ampliaron a muchas otras como parejas con fallas reiteradas de FIV convencional, fallas de inseminación artificial, baja respuesta ovárica y mala calidad ovocitaria. Como mencionamos al inicio, en la actualidad se estima que más de 100.000 niños nacen anualmente en el mundo con la ayuda de cualquiera de las técnicas vigentes de TRA.¹

En el presente trabajo hacemos hincapié en una técnica nueva de selección espermática "MACS", la cual se aplicó con éxito en un grupo de pacientes con altos niveles de fragmentación del ADN en las muestras de semen previa al ICSI. Por lo reportado hasta el día de la fecha es el primer reporte que compara los resultados reproductivos de la misma y los datos de los recién nacidos con respecto a las técnicas convencionales de reproducción asistida de alta complejidad (ICSI).

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 cols 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.¹⁵ Los autores concluyen que el tratamiento con antioxidantes en pacientes con daño en el ADN espermático antes del ICSI podría mejorar el pronóstico reproductivo. Sin embargo, 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.¹⁶

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.¹⁵ 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),¹⁷ y podría ser una opción en el tratamiento del factor masculino con altos niveles de fragmentación del ADN espermático.

Por otro lado, 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 polímeros 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 sepa-

ración magnética por columnas de anexina V. El principio consiste en que los espermatozoides con externalización de fosfatidilserina en la membrana plasmática deteriorada 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.¹⁸⁻²⁰ 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).

Algunas de las preocupaciones sobre la seguridad de esta nueva técnica han surgido, sobre todo si los espermatozoides seleccionados se van a utilizar para la ICSI. Usando microscopía electrónica de transmisión, Paasch y cols evidenciaron en la fracción de anexina V negativa que ésta no tenía microesferas unidas a la membrana plasmática de manera inespecífica.¹⁹ Además, en nuestra experiencia se ha realizado microscopía electrónica de barrido con los mismos resultados (datos no mostrados). Por lo que estas observaciones preliminares parecen indicar que los espermatozoides eluidos no muestran signos de la unión no específica a la superficie de los espermatozoides.

El primer resultado clínico de tipo prospectivo randomizado de una serie de pacientes que utilizaron MACS frente DGC (*Density Gradient Centrifugation*) fue reportado por Dirican y cols.²¹ En este informe hay dos grupos [MACS = 122 parejas; DGC (control) = 74 parejas], en donde se evidencia un incremento en la tasa de embarazo en el grupo que realizaron MACS. Otros trabajos publicados en el año 2009 presentan embarazos evolutivos de pacientes que realizaron TRA más MACS, en el cual el varón presentó espermatozoides con altos niveles de fragmentación del ADN. En los reportes no se manifestaron complicaciones fetales hasta ese momento de la gestación.^{10,11}

Estos avances crearon cierta inquietud sobre los resultados de los niños nacidos con estos novedosos tratamientos.

Dos trabajos publicados en el año 2009 analizan parte de la problemática asociada a los niños nacidos por TRA.

Sebastiani y cols, comparó los resultados obs-

tétricos y neonatales de las TRA (ICSI y FIV) con gestaciones espontáneas y concluyó en su trabajo que las TRA se asocian más a prematuridad (definida como gestación inferior a 37 semanas), bajo peso al nacer (definida como peso inferior al percentil 10 para su edad y sexo) y aumento de las enfermedades obstétricas, como hipertensión arterial, diabetes gestacional, amenaza de aborto, enfermedades placentarias y hemorragias.²²

Sanchis y cols, realizó un estudio prospectivo de 7.008 recién nacidos (113 tras FIV y 6.895 Fecundación Natural) y concluyó que la tasa de gemelaridad con FIV fue significativamente mayor con respecto a la fecundación natural (56,6% y 2,4% respectivamente) y que la tasa de defectos congénitos en los recién nacidos con FIV fue 5,3% vs 1,1% en recién nacidos tras fecundación espontánea ($P < 0,002$).²³

En nuestro trabajo no se encontraron diferencias significativas con respecto al número de embarazos (embarazo único: 82,5% oocitos propios-84% con oocitos donados), peso fetal (entre 1.000 y 2.499 gramos: 23% con oocitos propios y 18% con oocitos donados; entre 2.500 y 3.999 gramos: 72% con oocitos propios y 78% con oocitos donados), edad gestacional, complicaciones obstétricas ni fetales al comparar con los grupos controles.

En un reporte de la OMS publicado en mayo 2012 se informa que cada año unos 15 millones de bebés en el mundo, más de uno en 10 nacimientos, nacen demasiado pronto, según el recientemente lanzado informe *Nacido Demasiado Pronto: Informe de Acción Global sobre Nacimientos Prematuros*. Más de un millón de estos bebés mueren poco después del nacimiento; muchos otros sufren algún tipo de discapacidad física, neurológica o educativa, a menudo a un gran costo para las familias y la sociedad.

Nuestro trabajo, aunque no pretende comparar los resultados reproductivos y la presencia de malformaciones congénitas de las TRA con respecto a los embarazos concebidos naturalmente, muestra que hay mucho debate acerca de este tema.²⁴⁻²⁹ Algunos trabajos evidencian que existe un aumento significativo en los recién nacidos de defectos congénitos.³⁰⁻³²

En nuestro trabajo al comparar el Grupo I tanto con oocitos propios como donados con respecto a la variable "malformaciones congénitas" no se

encontró diferencias significativas con respecto a los grupos controles. El número de malformaciones congénitas en nuestro estudio concuerda con el esperado en la población general. Se evidenció un recién nacido con síndrome de Down en el grupo MACS con oocitos propios y en los grupos controles hubo un recién nacido con hipoplasia pulmonar y otro con hipoplasia craneal, los dos en TRA con ovodonación uno de cada grupo. No hubo muertes neonatales reportadas en nuestro trabajo.

Conclusión

En resumen, este trabajo ilustra la implementación satisfactoria y prometedora de la técnica MACS en casos de TRA en pacientes con altos niveles de fragmentación ADN espermático y los resultados reproductivos satisfactorios al igual que las TRA convencionales.

No se encontraron diferencias significativas al comparar los datos de los recién nacidos con MACS vs TRA convencional (factor masculino leve) y TRA convencional (factor masculino severo con TÚNEL y/o Caspasa normal).

Referencias

1. Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, Tarlatzis BC, Peters C, Henriët S, et al. A multi-centre cohort study of the physical health of 5 year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum Reprod* 2005;20:413-419.
2. 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.
3. Avendaño C, Franchi A, Taylor S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril* 2008; en prensa.
4. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010 Mar 1;93(4):1027-1036.
5. Marchetti C, Obert G, Deffosez P, et al. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 2002;17:1257-1265.
6. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005;11:337-349.
7. 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.
8. Said T, Agarwal A, Zborowski M, et al. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 2008;29:134-142.
9. Said TM, Grunewald S, Paasch U, et al. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online* 2005;10:740-746.
10. E Polak de Fried, Flavia Denaday, Nora Bouzas. Embarazo evolutivo luego del filtrado selectivo de espermatozoides con fragmentación de ADN en fallas de fertilización reiteradas, aplicando la separación magnética con Columnas de Anexina V, previo al ICSI (Bs As) *Reproducción* 2009; 24: 135-136.
11. Vanesa Y Rawe, Heydy Uriondo Boudri, Cristian Alvarez Sedó, et al. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI (Bs As) 2009.
12. A Carrascosa, D Yeste, A Copil, J Almar, S Salcedo y M Gussinyé. Patrones antropométricos de los recién nacidos pretérmino y a término (24-42 semanas de edad gestacional) en el Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron (Barcelona) (1997-2002). *An Pediatr (Barc)* 2004;60(5):406-416.
13. Mueller RF, Young ID. Genética y anomalías congénitas. En: Emery's Genética Médica. Madrid: Marbán; 2001. p.223-234.
14. Nussbaum RL, Mc Innes RR, Huntington FW. Genetics aspects of development. In: Thompson & Thompson' Genetics in Medicine. Philadelphia: Saunders; 2001. p.355-358.
15. Greco E, Romano S, Lacobelli M, et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Human Reprod* 2005;20:2590-2594.
16. Bolle P, Evandri MG and Saso L The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. *Contraception* 2002; 65:313-315.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, et al. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2004;81:802-809.
21. Dirican EK, Ozgün OD, Akarsu S, et al. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:375-381.

22. Sebastiani G, Pertierra Cortada A, Vidal Sorde' E, Balasch Cortina J, Figueras Aloy J. Factores relacionados con las técnicas de reproducción asistida y su reproducción en el neonato. *AnPediatr (Barc)* 2009.10.1016/j.anpedi.2009.01.011.
23. Sanchis A, Marcos Puig B, Juan García L, Morales Suárez-Varela M, Beledo Gómez A, Balanza' Machancosa R, et al. Características de los recién nacidos tras fecundación in vitro. *An Pediatr (Barc)* 2009.10.1016/j.anpedi.2009.02.002.
24. Frías JL. Técnicas de reproducción asistida y malformaciones congénitas. *Cuad Med Reprod* 2004;10:43-57.
25. Ludwig M. Is there an increase risk of malformation after assisted reproductive technologies? *Reprod Biomed Online* 2005;10:83-89.
26. Sutcliffe AG, Ludwig M. Outcome of assisted reproduction. *Lancet* 2007;370:352-359.
27. Basatemur E, Sutcliffe A. Follow-up of children born after ART. *Placenta* 2008;29:S135-140.
28. Reefhuis J, Honein MA, Schieve LA, Correa A, Hobbs CA, Rasmussen SA, the National Birth Defects Prevention Study. Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States. *Hum Reprod* 2009;24:360-366.
29. Lie RT, Lyngstadaas A, Orstavik KH, Bakketeig LS, Jacobsen G, Tanbo T. Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods: a meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2005;34:696-701.
30. Rimm AA, Katayama AC, Diaz M, Katayama KP. A meta-analysis of controlled studies comparing major malformations rates in IVH and ICSI infants with naturally conceived children. *J Assist Reprod Genet* 2004;21:437-443.
31. Hansen M, Bower C, Milne E, De Klerk N, Kurinczuk J. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects: a systematic review. *Hum Reprod* 2005;20:328-338.
32. Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, Derde MP, Camus M, Devroey P, et al. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod* 2002;17:671-694.