

Nacimientos sanos luego del uso de MACS+ICSI

Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGYR)

El siguiente reporte será publicado en parte en RBMonline a principios del 2010.

Reproducción 2009;24:206-208

La apoptosis en espermatozoides de eyaculado está caracterizada por eventos tempranos y tardíos. Dentro de los tempranos se pueden mencionar a la externalización de la fosfatidilserina de la membrana plasmática, mientras que la activación de la caspasa 3 y la fragmentación del ADN (medida, por ejemplo, con la técnica de TUNEL) son considerados eventos tardíos de muerte celular.

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 apoptosis que puede ser en gran medida responsable de una baja tasa de fecundación e implantación (Boe-Hansen y col, 2006; Avendaño y col, 2009). Hoy en día el estudio de apoptosis en muestras de semen es recomendado en hombres con algún trastorno andrológico como ser: varicocele, testículos en ascensor, edad avanzada (>45 años), teratozoospermia severa (índice de Kruger <4%), leucocitospermia, fumadores severos, con tratamiento de quimio o radioterapia, con intentos previos de reproducción asistida con fallas de fertilización o embriones de mala calidad, y casos de pérdidas gestacionales tempranas.

Alternativas terapéuticas ante elevados niveles de fragmentación del ADN espermático

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 otras palabras, ¿cómo tratamos al hombre con altos niveles de fragmentación espermática? En los últimos años han surgido distintas alternativas a las tradicionales (como la toma de antioxidantes o la obtención de espermatozoides testiculares), entre las cuales se encuentra un método no invasivo llamado columnas de Anexina V acoplada a pequeñas

esferas metálicas (~50 nm en diámetro) recubiertas por un polímero biodegradable (Said y col, 2005, 2006a y b, 2008). Las mismas pueden ser usadas para separar espermatozoides 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.

En el último congreso de SAMER organizado en marzo de 2009 reportamos los resultados de seguridad y eficacia de esta técnica y ese trabajo fue merecedor del Premio Accésit y a su vez fue publicado en el número pasado de esta misma revista. Posteriormente nuestro trabajo fue seleccionado a premio en la reunión de la REDLARA en Cancún, México, (abril de 2009) y allí se expusieron resultados clínicos con el uso de MACS (Libro de resúmenes 9º Taller General, RT28, páginas 63-66). El tiempo pasó y hoy en día con más de 130 casos realizados en pacientes afectados, estamos orgullosos de anunciar nuestros primeros nacimientos a partir de esta técnica acoplada al ICSI.

Paciente 1

El hombre: 40 años, con antecedente de neurocirugía por malformación arteriovenosa. Epilepsia en la adultez medicado desde 1994 con carbamazepina, actualmente sin episodios convulsivos. Dos años de esterilidad primaria por factor masculino. Espermogramas previos a la consulta con índices de Kruger entre 0 y 4% medicado con tamoxifeno y antioxidantes sin mejoría sustancial. Se solicita nuevo espermograma que informa: 40×10^6 espermatozoides/ml, movilidad a+b: 47%, morfología espermática por índice de Kruger: 7% (con 74% de anomalías cefálicas). Se realizan estudios de apoptosis en

muestra de semen y los mismos muestran 20% de fragmentación espermática (VN<20%) y Caspasa 3 activa de 27% (VN<11%). Se realizan estudios ultraestructurales (microscopía electrónica) en la muestra espermática y los mismos muestran normales niveles de compactación de la cromatina.

La mujer: 33 años, sin antecedentes relevantes. TSH 2,28 ATPO neg FSH 6,1 LH 1,7 PRL 13,9 E2 29. Histerosalpingografía normal. No se observan anomalías en ningún estudio prequirúrgico.

La pareja realiza tres inseminaciones intrauterinas y un ICSI sin embarazo. Las muestras de semen fueron preparadas por gradientes con recuperación entre 5 y 10 millones de espermatozoides/ml con una movilidad grado III del 50%.

Tras dos años de búsqueda de embarazo y luego del diagnóstico de altos niveles de fragmentación espermática y Caspasa 3 activa durante el estudio de diagnóstico, la pareja realiza MACS+ICSI luego de aprobación por nuestro Comité de Ética y firma de consentimiento informado.

Se la estimula con 225 UI de rFSH y agonistas desde fase lútea previa. Se obtienen 11 ovocitos (5MII, 5MI y 1GV), se inyectan 10 MII y fertilizan normalmente 7. Se transfieren dos embriones clase 3 que resultan en embarazo único y nacimiento de un varón sano el día 5 de noviembre de 2009 con 37 semanas (pretérmino). Parto por cesárea por placenta previa suboclusiva e inicio de trabajo de parto. El niño no necesitó terapia neonatal. Peso 3.000 g, adecuado para la edad gestacional y 48 cm. Evaluación neonatal normal.

Altos niveles de fragmentación espermática (núcleo verde) y Caspasa 3 activa (pieza media rojo) en la muestra de espermatozoides del día del diagnóstico.



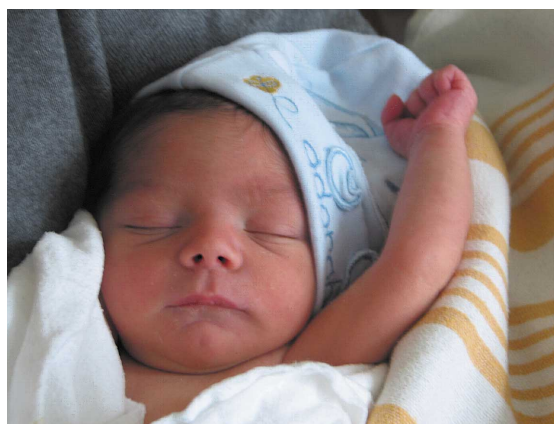
Paciente 2

El hombre: 38 años, 4 años de esterilidad primaria por factor masculino con varicocele bilateral tratado quirúrgicamente. Espermograma postquirúrgico: 30×10^6 espermatozoides/ml, movilidad a+b: 38%, morfología con índice de Kruger: 9%. Niveles de fragmentación espermática: 31% (VN<20%) y Caspasa 3 activa: 7% (VN<11%). Cariotipo normal.

La mujer: 37 años, FSH, LH y estradiol normal. No se observan anomalías en ningún estudio básico en la mujer. Cariotipo normal.

Luego de la toma de antioxidantes por tres meses, la pareja realiza 6 inseminaciones intrauterinas y un ICSI en otro centro del exterior sin embarazo (baja tasa de fecundación y regular calidad embrionaria).

Luego de aprobación por nuestro Comité de Ética, la pareja realiza MACS+ICSI. A partir de una estimulación de la ovulación con dosis convencionales de FSH recombinante, se obtienen un total de 7 ovocitos (5MII), de los cuales fecundan tres y en



día 3 se transfieren dos embriones de buena calidad que resultan en embarazo único y nacimiento de un varón sano luego de 39 semanas y 4 días (ver fotos) el día 26 de noviembre del 2009. El niño nació con 2.750 g, 48cm, y un puntaje de APGAR 9-9-9 al nacer. Evaluación neonatal normal.

Parámetros seminales, fragmentación del ADN y caspasa 3 activa de la muestra del día del procedimiento MACS+ICSI. Notar la importante reducción en los niveles de Fragmentación espermática en la fracción utilizada para ICSI Anexina V (-).

	Gradiente/pre- MACS®	Anexina V (-)	Anexina V (+)
Concentración	1 x 10 ⁶ /ml	600.000/ml	400.000/ml
% Viabilidad	49	64	0
% Movilidad (a+b+c)	30	43	0
% Fragmentación del ADN	25	10	70
% Caspasa-3 activa	8	7	20

Lectura recomendada

- Avendaño C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009;91(4): 1077-1084.
- Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersbøll AK, Christensen P. The sperm chromatin structure assay a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 2006;21(6): 1576-1582.
- Glander HJ, 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(2):109-115.
- Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum. Reprod* 2005; 20(1):226-230.
- Martin-Du Pan RC, 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(11):2984-2985.
- Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, Taylor S, Duran H, Beebe S. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod BioMed Online* 2003;7(4):469-476.
- Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander HJ. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 2003;24(2):246-252.
- Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ Jr, Glander HJ, Agarwal A. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod* 2004;71(6):1828-1837.
- Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2004;81(Suppl 1):802-809.
- Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Baumann T, Kriegel C, Li L, Agarwal A. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online* 2005;10(6):740-746.
- Said TM, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Glander HJ, Paasch U. Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod Biomed Online* 2006;13(3):336-339.
- Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Li L, Glander HJ, Thomas AJ Jr, Paasch U. Selection of Nonapoptotic Spermatozoa as a New Tool for Enhancing Assisted Reproduction Outcomes: An In Vitro Model. *Biol Reprod* 2006;74(3):530-537.
- Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 2008; 29(2):134-142.