

## Trabajo Fin de Grado

# Correlación Clínica entre la Fragmentación Espermática y la Presencia de Aneuploidías en el Espermatozoide

Autor:

Laura del Molino Álvarez

Director:

Antonio Urries López

Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza

2015

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
2.1. INFERTILIDAD.....	4
2.2. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL .....	4
2.3. INTEGRIDAD DEL DNA ESPERMÁTICO Y CAPACIDAD REPRODUCTIVA .....	7
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>11</b>
4.1. FECUNDACIÓN IN VITRO .....	11
4.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	11
4.3. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA .....	12
4.4. EVALUACIÓN DE LA MUESTRA.....	12
4.5. GRADIENTES DE DENSIDAD .....	13
4.6. FISH-E .....	14
4.7. SEPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES PREAPOPTÓTICOS MEDIANTE MACS.....	14
4.8. SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES MADUROS MEDIANTE PCSI .....	15
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>25</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>26</b>

## 1. Resumen

Desde que en 1978 naciera Louise Brown, el primer bebé probeta del mundo, las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA en adelante) han ido evolucionando en aras de mejorar y facilitar los resultados y procedimientos utilizados para conseguir un embarazo.

Actualmente la esterilidad por alteraciones genéticas en alguno de los gametos es considerada la causa de más difícil solución dentro de estas técnicas, por lo que la mayor parte de los esfuerzos en investigación en la actualidad van dirigidos a detectar posibles alteraciones genéticas y/o cromosómicas en el óvulo y espermatozoide y a la selección de gametos con una dotación cromosómica correcta.

En los últimos años se han desarrollado técnicas de selección genética (MACS y/o PICSI) con la intención de detectar y descartar espermatozoides con un alto grado de fragmentación en su DNA. Además recientes estudios parecen indicar que el uso de estas técnicas también es válido para seleccionar espermatozoides cromosómicamente normales evitando con ello la generación de embriones con aneuploidías por causa espermática.

A lo largo de este trabajo se va a intentar demostrar cómo estas técnicas de Selección Genética en el Espermatozoide (SGE en adelante) permiten la selección de espermatozoides sin fragmentación en su DNA y cromosómicamente normales. Todo ello de forma sencilla y no invasiva. De esta forma evitaremos la fecundación del óvulo por espermatozoides que nunca conseguirían dar un embarazo a término, ya que, como mucho, acabarían originando embarazos no evolutivos con desenlace de aborto o generando niños con problemas en el peor de los casos.

## **Abstract**

Since Louise Brown, the first test-tube baby, was born in 1978, the Assisted Reproduction Techniques have been developing in order to improve and facilitate the results and methods used to get pregnant.

Nowadays, the sterility caused by genetic alterations in one of the gametes is considered the most difficult problem to be solved in this field. For this reason, most efforts in current researching are focused on detecting genetic or chromosomal alterations in the oocyte and spermatozoa, and on selecting gametes with a proper chromosomal dotation.

In the last years, genetic selection techniques (MACS and PICSI) have developed in order to detect and discard spermatozoa with a high fragmentation rate in its DNA. In addition recent studies may indicate that using these techniques could be valid to select chromosomally normal sperm avoiding the generation of embryos with aneuploidy.

During this project we try to demonstrate how the use of these Genetic Sperm Selection techniques allows the selection of spermatozoa with no-fragmented DNA and with a normal chromosomal charge. This way we could prevent the fecundation of the oocyte with abnormal spermatozoa which could make difficult to get a healthy born baby.

## **2. Introducción**

### **2.1. Infertilidad**

Desde 2009, la infertilidad es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad del sistema reproductivo definida por la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas<sup>1</sup>.

Este trastorno afecta en torno al 16% de la población en edad fértil, lo que supone que 1 de cada 6 parejas tendrán problemas a la hora de tener un hijo<sup>2</sup>. La demanda creciente de los tratamientos de reproducción asistida por parejas con problemas de esterilidad hace necesaria la utilización de métodos cada vez más precisos para asegurar la evolución hacia el niño sano.

Se estima que la infertilidad masculina (factor masculino) es responsable del 35% de los casos de esterilidad<sup>3</sup> por lo que la calidad del semen empleado en las TRA ha pasado a considerarse uno de los factores clave para el éxito de las mismas. Por ello, actualmente, todas las técnicas relacionadas con el análisis y la mejora de la calidad seminal son de uso rutinario en laboratorios de reproducción.

Debido a la dificultad de la mejora de la calidad ovocitaria por el bajo número de óvulos obtenidos por ciclo frente a los millones de espermatozoides presentes en una única muestra, es en el campo de la mejora seminal en el que se centra este trabajo.

### **2.2. Evaluación de la calidad seminal**

Los primeros parámetros a tener en cuenta en el análisis espermático son la concentración, la motilidad y la morfología. El estudio de estas características se puede llevar a cabo por microscopía óptica y permite clasificar distintas patologías según los criterios establecidos por la OMS en 2010<sup>4</sup> (Tabla 1). Otras variables a tener en cuenta, esta vez mediante examen macroscópico, son el tiempo de licuefacción, la viscosidad, el volumen y el pH, todos ellos indicadores de la calidad seminal. La evaluación de estas características se conoce como seminograma.

Parámetro evaluado	Valor límite de referencia inferior
Licuefacción	Total a los 60 minutos
Viscosidad (formación de hilos)	< 2cm
Volumen	1,5 ml
Color	Blanco Opalescente
pH	> 7,1
Concentración	15 millones/ ml
Móviles totales	40%
Móviles progresivos	32%
Morfología	4%
Vitalidad	58%
Leucocitos	<1 millón/ml

Tabla 1: Parámetros seminales considerados normales por la OMS (2010)

En este mismo informe, la OMS sugería que las variables que más contribuyen a la obtención de embarazo, tanto *in vivo* como *in vitro* y, por tanto, se convierten en claros marcadores de la calidad seminal, son la concentración, la motilidad y la morfología.

#### 2.2.1. Concentración:

Según diversos estudios, un bajo recuento de espermatozoides está asociado a una menor tasa de embarazo<sup>5</sup>. Varios factores pueden contribuir a una disminución de la concentración espermática de manera puntual, como el periodo de abstinencia sexual o las condiciones fisiológicas en el momento de la recogida.

Existen una serie de patologías asociadas a la baja concentración de espermatozoides en el eyaculado como la azoospermia (ausencia de espermatozoides en el eyaculado), la criptoospermia (espermatozoides no observados en la muestra en fresco pero si en el pellet tras la centrifugación) o la oligozoospermia (número total de espermatozoides por debajo de 15 millones/ml). Todas ellas contribuyen a una menor tasa de fecundación tanto *in vivo* como *in vitro* debido a la menor probabilidad de unión óvulo-espermatozoide.

### 2.2.2. Morfología:

El porcentaje de formas normales está altamente relacionado con la capacidad fecundante *in vivo* y con la capacidad de desarrollo embrionario<sup>6</sup>. De hecho, se ha demostrado que un porcentaje elevado de formas espermáticas anormales, conocido como teratozoospermia, se asocia con fallos en la fertilización, una mala morfología embrionaria y una baja tasa de embarazo<sup>7</sup>. Por lo tanto, los espermatozoides anormales generalmente presentan un menor potencial de fecundación.

Una de las explicaciones para esta asociación es que los espermatozoides normales nadan más rápido y más recto y presentan una mayor frecuencia de golpe flagelar mientras que las anomalías morfológicas se han asociado con alteraciones de la motilidad, siendo esta muy lenta o inexistente<sup>8</sup>. Esto puede deberse a una hidrodinámica deficiente por anomalías en la morfología de la cabeza o el flagelo que impiden un movimiento normal, o a una disminución de la frecuencia del ritmo del flagelo debida a alteraciones en la producción de energía intracelular.

Sin embargo, si bien se ha demostrado que la morfología se relaciona de forma inversa con la motilidad y que esto es un factor fundamental para la fecundación *in vivo*, no existe consenso acerca de la menor capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides morfológicamente anormales<sup>9</sup>.

### 2.2.3. Motilidad:

La motilidad espermática también está relacionada con las tasas de embarazo según la bibliografía<sup>10</sup>. Una de las principales causas de infertilidad masculina es precisamente la disminución de la motilidad espermática, denominada astenozoospermia, y que puede deberse a anomalías en la morfología, o a anomalías metabólicas en el mecanismo de producción y transducción de la energía dentro de la célula que influyen en la eficacia del golpe flagelar. La motilidad de una muestra de semen depende, además, del ambiente y de las condiciones de análisis.

Por eso, el recuento de espermatozoides móviles totales (REMT) se utiliza también como diagnóstico de un factor masculino. Esta técnica se usa de manera habitual en el laboratorio para separar los espermatozoides móviles y, por tanto, con mejor pronóstico reproductivo, de aquellos inmóviles, además de restos celulares y factores que inhiben la capacitación.

A pesar de que el seminograma es una cita ineludible para el inicio de un tratamiento de Reproducción Asistida, la variabilidad en los valores límite de referencia en los últimos años<sup>11</sup> así como la subjetividad en la evaluación por los distintos centros de análisis, hacen que el estudio de estas características sea un pobre indicador de la capacidad reproductora masculina. Por otro lado, la existencia de pacientes con unas características morfológicas y de motilidad espermática normales, que presentan repetidos fallos de implantación (FI) o abortos de repetición (RAB), pueden indicar la presencia de otros factores que influyen en la calidad seminal.

### 2.3. Integridad del DNA espermático y capacidad reproductiva

La integridad genética y bioquímica del espermatozoide es esencial para asegurar la competencia reproductiva, sin embargo, la espermatogénesis envuelve procesos que pueden poner en peligro la integridad del DNA espermático. Se ha demostrado que existe una correlación entre la presencia de aneuploidías y daños en el DNA con repetidos fallos de implantación y anomalías en el desarrollo embrionario<sup>12</sup>. De hecho, los pacientes que presentan una elevada tasa de fragmentación espermática, así como los que presentan anomalías cromosómicas en sus espermatozoides coinciden en unos resultados significativamente más negativos en las técnicas de reproducción asistida<sup>13</sup>.

Sin embargo, estos fallos en el material genético espermático no implican necesariamente una morfología anormal del espermatozoide<sup>14</sup> ni alteraciones en su motilidad, lo que podría explicar la existencia de varones infértiles con un seminograma normal. Un estudio realizado por el equipo de Conrado Avendaño et al. con este tipo de pacientes reveló que una de las causas principales de la disminución de la capacidad reproductiva tanto *in vivo* como *in vitro* era la fragmentación del DNA espermático<sup>15</sup>.

Por otro lado, recientes estudios han demostrado que un alto nivel de fragmentación del DNA espermático no está necesariamente asociado con anomalías morfológicas en las primeras fases de división embrionaria pero afecta a la tasa de implantación<sup>16</sup>. Esto supone que la fecundación con espermatozoides morfológicamente normales pero con daños o alteraciones en su DNA, generaría embriones con patrones de desarrollo temprano normales pero podrían afectar al



desarrollo tardío del embrión produciendo fallos de implantación o abortos de repetición.

Por todas estas razones queda claro que la causa genética es el principal problema a solucionar dentro de las TRA.

Eso llevó al desarrollo de técnicas diagnósticas como el FISH-e o los Estudios de Fragmentación que, aplicadas sobre el espermatozoide, han permitido detectar sémenes con una alta incidencia de aneuploidías que, en caso de fecundar al óvulo, van a producir una alta tasa de embriones cromosómicamente alterados que difícilmente van a generar un bebé sano. Sin embargo estas técnicas, si bien permiten evaluar la calidad seminal, no permiten seleccionar los espermatozoides sanos para utilizarlos en la fecundación de los ovocitos por lo que el resultado es meramente informativo y sólo nos indica la existencia de una alta probabilidad de generar embriones aneuploides.

Frente a ello, la única opción era la aplicación de técnicas de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), que permite detectar anomalías genéticas en el embrión antes de ser implantado mediante la extracción y el estudio de una de sus células. De esta forma se pueden seleccionar los embriones sanos para ser transferidos. El principal problema de estas técnicas es que son muy costosas tanto a nivel económico como de procedimiento e incluso puede ser agresivo para el embrión, por lo que puede resultar de gran interés detectar de forma previa estos espermatozoides con daños en su DNA.

Ilustración 1: Imagen de un embrión en 6 células. En el DGP una de estas células es biopsiada y analizada para detectar posibles daños en el material genético.



Las técnicas de SGE como las columnas de anexina (MACS) o la ICSI fisiológica (PICSI) se desarrollaron inicialmente para detectar espermatozoides con alto grado de fragmentación<sup>17</sup> en su DNA pero últimas investigaciones han demostrado que pueden ser capaces de seleccionar igualmente espermatozoides cromosómicamente normales evitando con ello la generación de embriones con aneuploidías por causa espermática<sup>12</sup>.

### 2.3.1. MACS: Magnetic-Activated Cell Sorting:

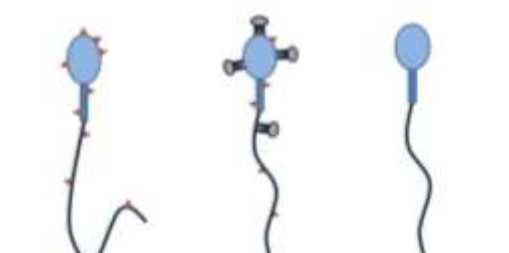


Ilustración 2: a) espermatozoide preapoptótico con externalización de PS. b) Moléculas de anexina V unidas a la PS y a una esfera magnética. c) Espermatozoide normal

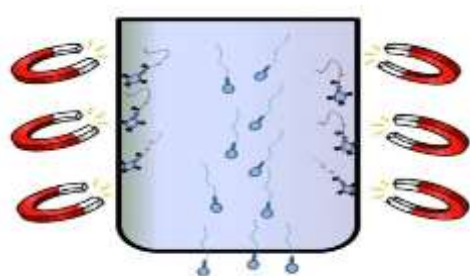


Ilustración 3: Esquema de funcionamiento de las MACS. Los espermatozoides unidos a la anexina V quedan atrapados por el imán mientras que los espermatozoides viables eluyen.

Esta técnica se basa en la externalización de fosfatidil serina (PS) en la membrana de los espermatozoides preapoptóticos. Se utilizan moléculas de anexina V acopladas a pequeñas esferas metálicas de unos 50 nm de diámetro. La anexina V se une a la PS de la membrana de las células preapoptóticas. Con la ayuda de un imán, podemos atraer y retener las esferas metálicas, acopladas a los espermatozoides no viables. De esta forma, si hacemos pasar la muestra mezclada con estas moléculas de anexina por una columna rodeada por un imán, los espermatozoides que presenten este marcador apoptótico quedarán retenidos mientras que los que sean viables, eluirán y serán recogidos para ser utilizados en la fecundación del ovocito.

### 2.3.2. PICSI: Physiological IntraCytoplasmic Sperm Injection:

Esta técnica fue diseñada para mejorar la utilización de la ICSI convencional en la que la selección del espermatozoide es arbitraria y basada sólo en características morfológicas. Con la PICSI se seleccionan espermatozoides maduros que son capaces de unirse al ácido hialurónico, componente principal de la membrana ovocitaria. De esta forma, los espermatozoides que se unan a las gotas de ácido hialurónico, presentarán receptores en su membrana que serían capaces de reconocer el ovocito y fecundarlo. Con esta técnica, la ICSI se realiza con espermatozoides maduros, que serían capaces de fecundar al ovocito en condiciones fisiológicas.

La aplicación de estas técnicas de forma rutinaria en los laboratorios de reproducción asistida podría permitir la disminución de embriones con daños en el DNA, mejorando los resultados de las TRA y reduciendo la tasa de abortos y fallos de implantación.

### **3. Objetivos**

- Evaluar las técnicas de SGE (MACS y/o PICSI), indicadas inicialmente para detectar espermatozoides con DNA fragmentado, en la selección de espermatozoides cromosómicamente normales para su uso en ciclos de Fecundación In Vitro (FIV).
- Comprobar si existe diferencia entre las tasas de embarazo de pacientes con FISH-e normal sometidos a un tratamiento de FIV/ICSI convencional y aquellos con FISH-e alterado que se someten a una técnica de SGE previa al tratamiento.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS:**

### **4.1. Fecundación In Vitro**

Todas las parejas incluidas en el estudio fueron sometidas a técnicas de Fecundación In Vitro según los procedimientos habituales.

La técnica de fecundación utilizada varió según la calidad seminal aportada por el varón principalmente en base al número de espermatozoides presentes en la muestra. Si el número era inferior a 2 millones la técnica de elección fue la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Si el número era superior a 2 millones la técnica fue de FIV convencional (microgota).



Ilustración 3: Imagen de una Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) al microscopio óptico.

### **4.2. Población de estudio:**

Se trata de un análisis retrospectivo realizado sobre 690 ciclos realizados en la Unidad de Reproducción Asistida de Quirón Zaragoza entre julio de 2014 y junio de 2015. Previo a cualquier tratamiento, se obtuvieron las serologías para descartar enfermedades de tipo infeccioso. Se divide a los pacientes en tres grupos de estudio:

- Grupo A: consistente en pacientes que presentan un FISH-e alterado pero no se realizan técnicas de SGE. (n=143 ciclos)
- Grupo B: formado por pacientes con FISH-e alterado a los que se les realizan técnicas de SGE. (n=92 ciclos)
- Grupo Control: compuesto por pacientes con FISH-e normal.(n=455 ciclos)

Las indicaciones para realizar FISH-e fueron presentar un Factor masculino severo, parejas con fallos de implantación o abortos de repetición de etiología desconocida.

#### 4.3. Obtención de la muestra:

Siguiendo las recomendaciones de la OMS 2010 y de la Sociedad Europea de Embriología y Reproducción Humana, las muestras fueron obtenidas por masturbación en un bote estéril de boca ancha tras un periodo de 2 a 7 días de abstinencia y entregadas en el laboratorio el mismo día de la punción folicular en un tiempo inferior a una hora desde su recogida. En el caso de presentar problemas en la recogida de muestra, los pacientes fueron citados días antes de la punción y se procedió a la congelación de semen previa a Fecundación in Vitro (FIV).

#### 4.4. Evaluación de la muestra

Se analizó la licuefacción (completa o no) de la muestra tras 20 minutos de reposo después del eyaculado. En caso de no ser completa y presentar una elevada viscosidad, se pasó la muestra por una aguja de jeringa hasta obtener un semen homogéneo.

Se midió el volumen de la muestra mediante una pipeta graduada de 10 ml y para el estudio de la concentración, movilidad y morfología se utilizó una cámara Makler en la que se depositó una gota del eyaculado. La cámara Makler tiene una profundidad de 10  $\mu\text{m}$  que permite la movilidad de los espermatozoides en un plano. Al microscopio se observa una cuadrícula de 10x10 filas de 0'01  $\text{mm}^2$  por cuadro (0'1x0'1). De esta forma la medida de concentración se obtuvo de multiplicar el promedio del conteo de tres filas o columnas por el factor  $10^6/\text{ml}$ .

La morfología se evaluó a simple vista teniendo en cuenta tanto las formas móviles como inmóviles y considerándose como normal un 4% de espermatozoides con morfología adecuada.

En cuanto a la movilidad se evaluaron los parámetros en base a la clasificación realizada por la OMS 2010<sup>1</sup>:

- Móviles progresivos (A+B): Los espermatozoides se mueven activamente, ya sea de manera lineal o en círculos, independientemente de la velocidad
- Móviles no progresivos (C): Incluye todos los patrones de movilidad pero con ausencia de progresión como el avance en pequeños círculos.
- Inmóviles (D): Sin movimiento.

Una vez evaluada la cantidad y calidad de la muestra seminal, se procedió a la elección de la técnica de selección. En muestras de muy mala calidad, a los varones incluidos en el grupo B, se les realizó una selección por PICSi mientras que en aquellas con una concentración espermática elevada en las que íbamos a realizar “microgota” se utilizó la técnica MACS. En ambos casos se realiza el lavado por gradientes de densidad.

## 4.5. Gradientes de densidad:

Tras el análisis en la cámara Makler se utilizó el resto de la muestra para realizar gradientes de densidad y recuperar la fracción de espermatozoides con mejor movilidad, así como eliminar sustancias descapacitantes.

Se prepararon de 1 a 3 tubos de gradientes en función del volumen y la calidad de la muestra. Los tubos contenían dos capas de *PureSperm*<sup>®</sup>100 a distintas densidades. La capa inferior contiene 2ml de *PureSperm*<sup>®</sup>100 al 80% y la superior 2ml de *PureSperm*<sup>®</sup>100 al 40%. Se deposita toda la muestra repartida entre los diferentes tubos y se centrifuga a 2000 revoluciones durante 20 minutos. De esta forma los restos seminales y el plasma seminal quedan arriba y precipitan las células lavadas. Se realizó un segundo lavado resuspendiendo el pellet con 4 ml de *G-IVF*<sup>™</sup> atemperado. Se centrifugó durante 10 minutos a 2000 rpm tras lo cual se resuspendió de nuevo el pellet hasta llegar a una concentración adecuada de espermatozoides para la técnica que vamos a utilizar (3-5 mill/ml para FIV, 1-3 mill/ml para ICSI).

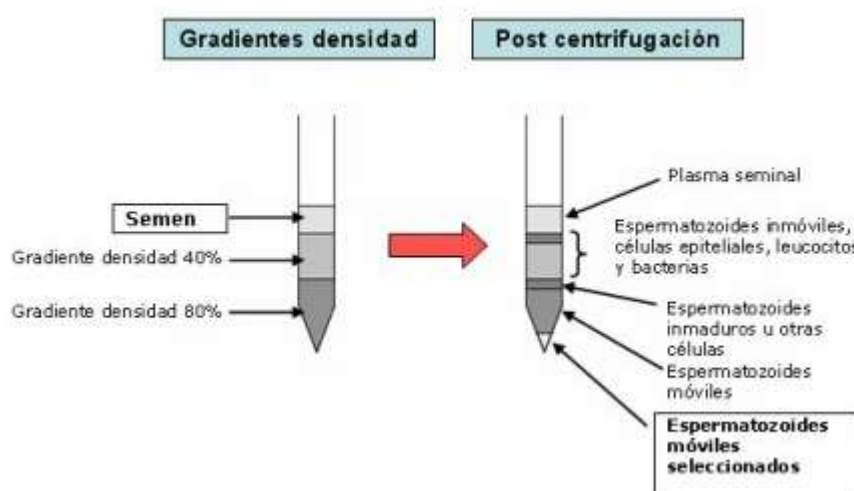


Ilustración 4: Se muestra el aspecto de los gradientes de densidad antes y después de la centrifugación. Los espermatozoides móviles y de mejor calidad quedan en el pellet separados del plasma seminal y de espermatozoides inmaduros. En el segundo lavado se resuspende este pellet y se vuelve a centrifugar. El pellet final es el que se utilizará para la fecundación de los ovocitos

Hay que destacar que para el empleo de la técnica MACS, el lavado por gradientes se realiza después del paso de la muestra por la columna. En este caso los gradientes contenían 0,5 ml de *PureSperm*®100 por capa.

#### 4.6. FISH-e:

El FISH es una técnica citogenética que permite el marcaje de cromosomas mediante sondas fluorescentes permitiendo la detección de anomalías en la carga genética como aneuploidías, microdelecciones, duplicaciones o inversiones de una forma eficaz y rápida. En reproducción asistida se utiliza esta técnica para detectar sémenes con alta incidencia de aneuploidías por lo que este estudio se lleva a cabo en los espermatozoides.

El análisis se llevó a cabo en varones con cariotipo normal (46, XY). Para cada muestra se determinó la incidencia de disomías y diploidías para los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21, así como la proporción de espermatozoides portadores del cromosoma X e Y. Para ello se realizaron dos hibridaciones sobre dos portaobjetos diferentes utilizando las siguientes combinaciones de sondas: Kit FISH Diagnóstico Aneuploidías (Genycell-Biotech): CEP18 - Sonda



Ilustración 5: Fotografía de un FISH-e. Se marcan en rojo los cromosomas X, en verde los Y y en azul el cromosoma 18. Se aprecia un espermatozoide aneuploide (rodeado) que contiene tanto el cromosoma X como el Y.

satélite del cromosoma 18 en Aqua; CEPX - Sonda satélite del cromosoma X en Verde; CEPY - Sonda satélite del cromosoma Y en rojo. Mix Prenatal Cromosomas 13/21: 13q14.2 - Sonda Locus Único cromosoma 13 en Verde; 21q22.13 - Sonda Locus Único cromosoma 21 en Rojo. Las indicaciones para realizar FISHe fueron: I. Presentar un Factor masculino severo ( $REM \leq 1 \text{ mill /ml}$ ). II. Factor masculino ligero ( $REM 2-15 \text{ mill/ml}$ ) en parejas con fallos de implantación (si tras transferencia de 6 embriones no se ha conseguido embarazo). III. Abortos de repetición de etiología desconocida ( $\geq 2$ ).

### TÉCNICAS DE SELECCIÓN GENÉTICA ESPERMÁTICA

#### 4.7. Separación de espermatozoides apoptóticos mediante MACS

Utilizada en varones del grupo B con muestras seminales con concentración superior a 2 mill/ml de espermatozoides.

Los espermatozoides preapoptóticos fueron eliminados de la muestra mediante separación magnética utilizando *MACS<sup>®</sup>ART Annexin V Kit (Milteny Biotec)*.

Se midió el volumen de la muestra de semen fresco y se diluyó con el doble de *MACS<sup>®</sup>ART Annexin V Binding-Buffer*. Se centrifugó durante 4 minutos a 2000 rpm y el sobrenadante fue descartado. Se resuspendió el pellet en 100 µl de *MACS<sup>®</sup>ART Annexin V-Reagent* y se completó hasta un volumen final de 500 µl con *MACS<sup>®</sup>ART Annexin V Binding-Buffer*. La mezcla se dejó incubando a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos.

Antes de pasar la muestra, se lavó la columna (colocada en el soporte magnético) con 1 ml de *MACS<sup>®</sup>ART Annexin V Binding-Buffer*. Se desechó el tubo donde se había recogido este primer lavado.

A continuación se procedió al paso de la muestra por la columna y se esperó a que eluyera en un tubo de fondo cónico debidamente rotulado. Una vez recogidos los 500 µl en el tubo, se lavó la columna con 500 µl de *MACS<sup>®</sup>ART Annexin V Binding-Buffer* que se recogieron en el mismo tubo.

Posteriormente se realizó el lavado de la muestra por gradientes de densidad.

#### **4.8. Selección de espermatozoides maduros mediante PICS**

Utilizada en varones del grupo B con muestras seminales con concentración inferior a 2 mill/ml de espermatozoides.

El *Sistema de Selección de Espermatozoides mediante PICS<sup>®</sup>* consiste en una placa de poliestireno con tres micropuntos de hialuronato fijados en la parte inferior interior. Existen tres líneas de localización grabadas en la parte inferior exterior que permiten localizar los micropuntos.

Se hidrataron los micropuntos de hialuronato colocando gotas individuales de 10µL de un diluyente de espermatozoides adecuado (en este caso utilizamos *G-MOPS<sup>TM</sup>* de *Vitrolife*) cubriendo el área en la que está situado el micropunto. Las gotas de PVP (polivinilpirrolidona) utilizadas para ralentizar el movimiento espermático y mejorar la manipulación de los espermatozoides en la Inyección Intracitoplasmática (ICSI) también fueron colocadas en otra parte de la placa en este momento. En este caso



utilizamos el PVP comercial *ICSI™* de *Vitrolife*. Se cubrió la placa con aceite para cultivo tisular (*OVOIL™* de *Vitrolife*).

Se agregaron los espermatozoides al micropunto prehidratado en un volumen aproximado de 10  $\mu$ L

La hidratación del micropunto antes de aplicar los espermatozoides da tiempo al hialuronato para hincharse. Normalmente el proceso de hinchado y la unión de los espermatozoides comienzan en 5 min o menos. No obstante, algunos micropuntos pueden requerir 30 minutos o más para alcanzar su capacidad de unión máxima.

Por ello se dejó reposar la placa prehidratada durante 20-30 minutos a una temperatura inferior a 30°C para facilitar la unión.

. Tras este tiempo, los espermatozoides maduros se habían unido al hialuronato. Estos espermatozoides se unen por la cabeza al hialuronato por lo que no presentan migración progresiva a pesar del movimiento vigoroso de la cola.

La recogida de espermatozoides unidos se realiza con la aguja de ICSI. Los espermatozoides maduros se trasladan a las gotas de PVP donde se inactiva la cola y se reevalúa su motilidad y morfología. Desde la gota de PVP se seleccionan y se cargan los espermatozoides procesados para su inyección en ovocitos según su protocolo de inyección estándar.

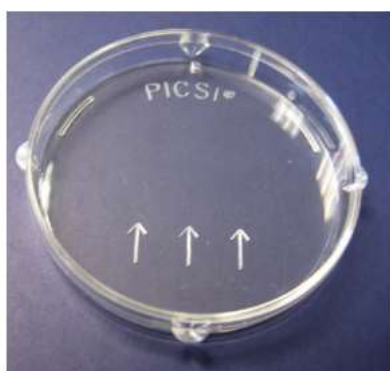


Ilustración 6: Fotografía de una placa de PICSi. Las flechas señalan la posición de los puntos de hialuronato donde se fijarán los espermatozoides maduros.

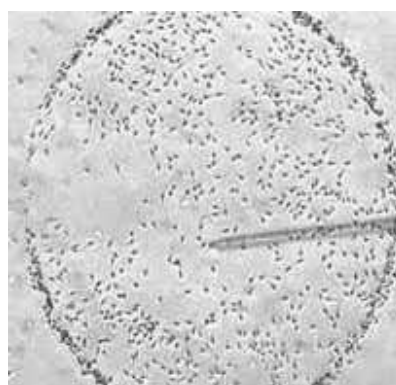


Ilustración 7: Espermatozoides unidos a una gota de ácido hialurónico. Sólo los espermatozoides maduros que expresan receptores de hialuronato en su superficie son capaces de unirse.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Como hemos comentado a lo largo de este trabajo, la integridad genética de los espermatozoides es indispensable a la hora de generar embriones sanos que puedan dar lugar a un embarazo<sup>12</sup>. Las técnicas de diagnóstico como el FISH-e son capaces de darnos información muy útil acerca de la calidad del semen empleado en las TRA pero su uso es meramente diagnóstico.

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) ha sido durante muchos años la única opción para facilitar la transferencia en el útero materno de embriones cromosómicamente sanos pero su misma aplicación genera dos problemas: por un lado, la manipulación agresiva del embrión ocasionada por la extracción de una de sus células y, por otro lado, al ser un estudio realizado directamente en el embrión no nos permitía controlar que la fecundación la realizara un espermatozoide sano. Ahí radica el interés de encontrar una técnica que permita realizar esa selección en una fase previa a la fecundación del óvulo. Técnicas a las que hemos llamado de SGE.

En este trabajo se pretende demostrar cómo estas técnicas, que se desarrollaron inicialmente para eliminar los espermatozoides con el DNA fragmentado<sup>17</sup>, son capaces de seleccionar espermatozoides euploides y reducir con ello el riesgo de obtener embriones aneuploides.

Para ello, en los grupos A y B, se han seleccionado parejas diagnosticadas de fallos de implantación, abortos de repetición, oligospermia severa y DNA espermático alterado detectado mediante técnicas de Hibridación In Situ por Fluorescencia (FISH).

A fin de evitar manipulaciones innecesarias sobre el embrión humano evaluaremos el resultado del estudio en base a porcentajes de embarazo y tasas de aborto tras ciclos de FIV comparando un grupo control (con semen normales), parejas con varones con FISHe alterado a los que no se les ha realizado SGE (grupo A) y parejas con semen alterados a los que se les ha realizado SGE (grupo B).

### **5.1. Tasas de embarazo**

#### **Grupo control: FISH-e normal.**

Se muestran en las tablas (Tablas 2, 3 y 4) la cantidad de ciclos totales, de embarazos, embarazos evolutivos y abortos entendiendo como embarazo:  $\beta$ -HCG

positiva en sangre a los 15 días tras la transferencia del embrión; embarazo evolutivo:  $\beta$ -HCG positiva en sangre y ecografía con latido tres semanas después; y aborto: embarazos con beta positiva en los que no se llega a detectar latido ecográfico.

Se hicieron igualmente dos grupos en función de la procedencia del óvulo: óvulos propios (OP) corresponde a óvulos obtenidos de parejas sometidas a ciclos de FIV con edades comprendidas entre los 35 y 40 años y óvulos de donante (OD) corresponde a ciclos en los que los óvulos proceden de mujeres que donan sus óvulos de forma altruista a otras parejas y con edades comprendidas entre 18 y 35 años.

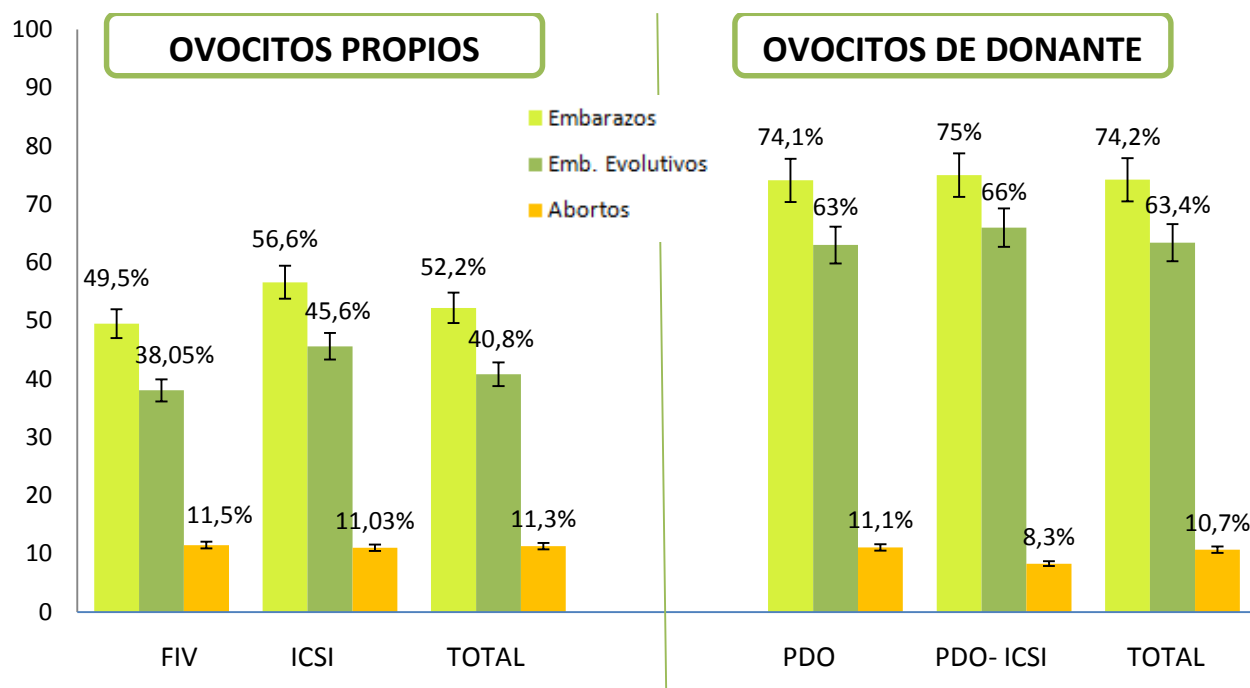
**Tabla 2:** Número de transferencias, embarazos totales, embarazos evolutivos y abortos en la población control, consistente en parejas que presentan un semen con FISH-e normal. Se diferencian las técnicas de Fecundación in vitro convencional (FIV) y la Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Así mismo se separan los pacientes en aquellos que utilizan óvulos propios y los que recurren a la donación de ovocitos (PDO).

	ÓVULOS PROPIOS			ÓVULOS DE DONANTE		
	FIV	ICSI	TOTAL	PDO	PDO+ICSI	TOTAL
<b>Ciclos</b>	226	136	362	81	12	93
<b>Embarazos</b>	112	77	189	60	9	69
<b>Embarazos evolutivos</b>	86	62	148	51	8	59
<b>Abortos</b>	26	15	41	9	1	10

**Tabla 3:** Tasas de embarazo, embarazo evolutivo y aborto en el grupo control (FISH-e normal). El porcentaje de embarazo evolutivo y aborto se calcula en función de los ciclos totales. (Los valores marcados con (\*)) representan el porcentaje de embarazo evolutivo y aborto, respectivamente, en función de los embarazos totales y no de los ciclos totales).

	ÓVULOS PROPIOS			ÓVULOS DE DONANTE		
	FIV	ICSI	TOTAL	PDO	PDO+ICSI	TOTAL
<b>%Embarazos</b>	49,5%	56,6%	52,2%	74,1%	75%	74,2%
<b>% Embarazos evolutivos</b>	38,05%	45,6%	40,8%	63%	66%	63,4%
	(76,8%)*	(80,5%)*	(78,3%)*	(85%)*	(88,9%)*	(85,5%)*
<b>%Abortos</b>	11,5%	11,03%	11,3%	11,1%	8,3%	10,7%
	(23%)*	(19,5%)*	(21,7%)*	(15%)*	(11,1%)*	(14,5%)*

**Tabla 4:** Representación gráfica del porcentaje de embarazos, embarazos evolutivos y abortos en el grupo control (FISH-e normal). Se separan las poblaciones entre óvulos propios (OP) y de donante (OD). Los porcentajes de embarazos evolutivos y abortos se calculan con respecto al total de ciclos.



En los resultados del grupo control podemos apreciar que la tasa de embarazo es del 52,2% cuando se utilizan ovocitos propios mientras que es del 74,2% en la donación de ovocitos. Las tasas de aborto sin embargo se mantienen más o menos constantes en torno al 11 %. Consideraremos estos porcentajes como control, comparando a los dos grupos de estudio con los mismos.

## Grupo A: Pacientes con FISH-e alterado en los que no se realiza SGE.

Se muestra en la tablas el número de ciclos totales así como el número de embarazos y el porcentaje de embarazo en función de los ciclos totales (Tablas 5, 6 y 7).

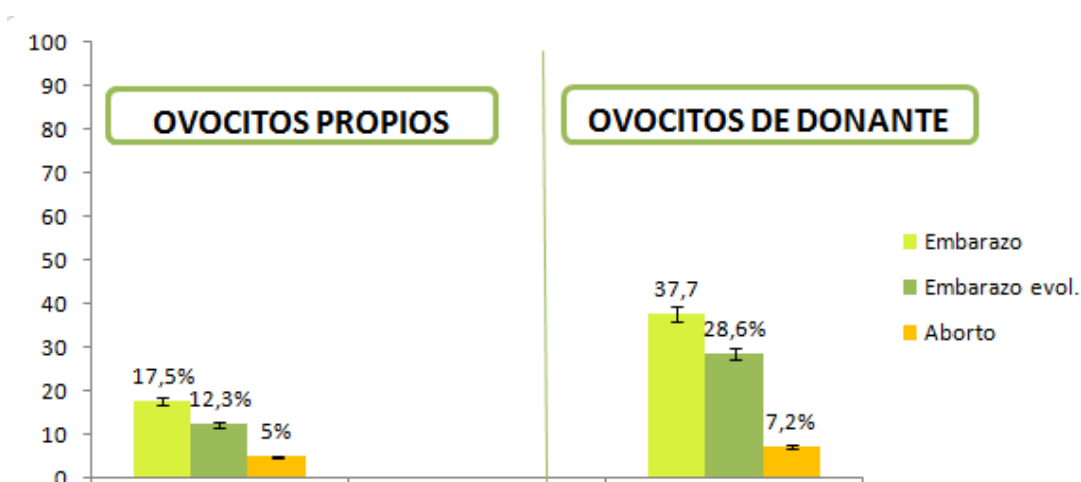
**Tabla 5:** Datos correspondientes al Grupo de estudio A en el que se incluyen pacientes con FISH-e alterado a los que no se les ha realizado SGE. Se muestran datos de ciclos totales y embarazos.

	ÓVULOS PROPIOS	ÓVULOS DE DONANTE
	FIV	PDO
Ciclos	97	14
Embarazos	17	5
Embarazos evolutivos	12	4
Abortos	5	1

**Tabla 6:** Datos correspondientes a los porcentajes de embarazo, embarazo evolutivo y aborto en el Grupo de estudio A en el que se incluyen pacientes con FISH-e alterado a los que no se les ha realizado SGE.

	ÓVULOS PROPIOS	ÓVULOS DE DONANTE
	FIV/FIV-ICSI	PDO/PDO-ICSI
%Embarazos	17,5 %	37,7%
% Embarazos evolutivos	12,3% (70,6%)*	28,6 % (80%)*
%Abortos	5% (29,4%)*	7,2 % (20%)*

**Tabla 6:** Datos correspondientes a los porcentajes de embarazo, embarazo evolutivo y aborto en el Grupo de estudio A en el que se incluyen pacientes con FISH-e alterado a los que no se les ha realizado SGE.



En este caso el porcentaje de embarazo es de 17,5% con ovocitos propios y del 37,7% con ovocitos de donante. Si bien se sigue notando un aumento de las tasas de embarazo con la utilización de ovocitos donados, es evidente que el porcentaje de embarazo es mucho menor en ambos casos. Esto es debido a que la calidad del semen utilizado no es óptima y da lugar a embriones que o bien no evolucionan correctamente o producen fallos de implantación. Estos dos supuestos producen una reducción significativa en las tasa de embarazo.

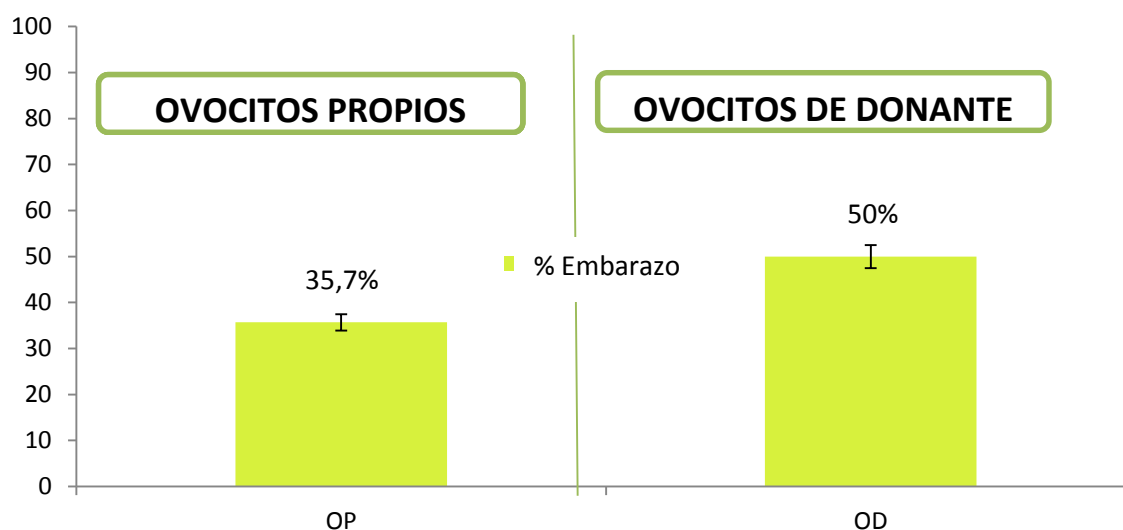
Grupo A\*: Pacientes con FISH-e alterado en los que no se realiza SGE pero sí DGP.

Dentro del grupo de pacientes con FISH-e alterado en los que no se realiza SGE, introducimos un subgrupo A' de pacientes en los que se realiza un DGP. Se analizan únicamente los embarazos ya que el grupo es muy reducido y no hemos recopilado mayor información (Tablas 8 y 9).

**Tabla 8:** Porcentaje de embarazo en pacientes con FISH-e alterado en los que se realiza un DGP

	ÓVULOS PROPIOS	ÓVULOS DE DONANTE
	FIV+ DGP	PDO+DGP
<b>Ciclos</b>	28	4
<b>Embarazos</b>	10	2
<b>No embarazos</b>	18	2
<b>% Embarazo</b>	35,7%	50%

**Tabla 9:** Representación gráfica de los porcentajes de embarazo en parejas con FISH alterado sobre los que se realiza DGP



Por otra parte observamos como al realizar DGP sobre estos embriones (tabla 9) el número de embarazos por ciclo aumenta pero no llega a los niveles del grupo control (52,2% en OP y 74,2% en OD). Esto se debe a que en un ciclo realizado con un semen con FISH-e alterado sin poder hacer una selección previa de los espermatozoides el número de embriones viables que se van a poder transferir se

reduce drásticamente pudiendo llegar a ser cero y, por tanto, disminuyen las probabilidades de éxito.

Grupo B: Pacientes con FISH-e alterado en los que se realiza SGE.

En este grupo se incluyen 92 ciclos realizados sobre pacientes con FISH-e alterado a los que se les ha realizado alguna técnica de SGE.

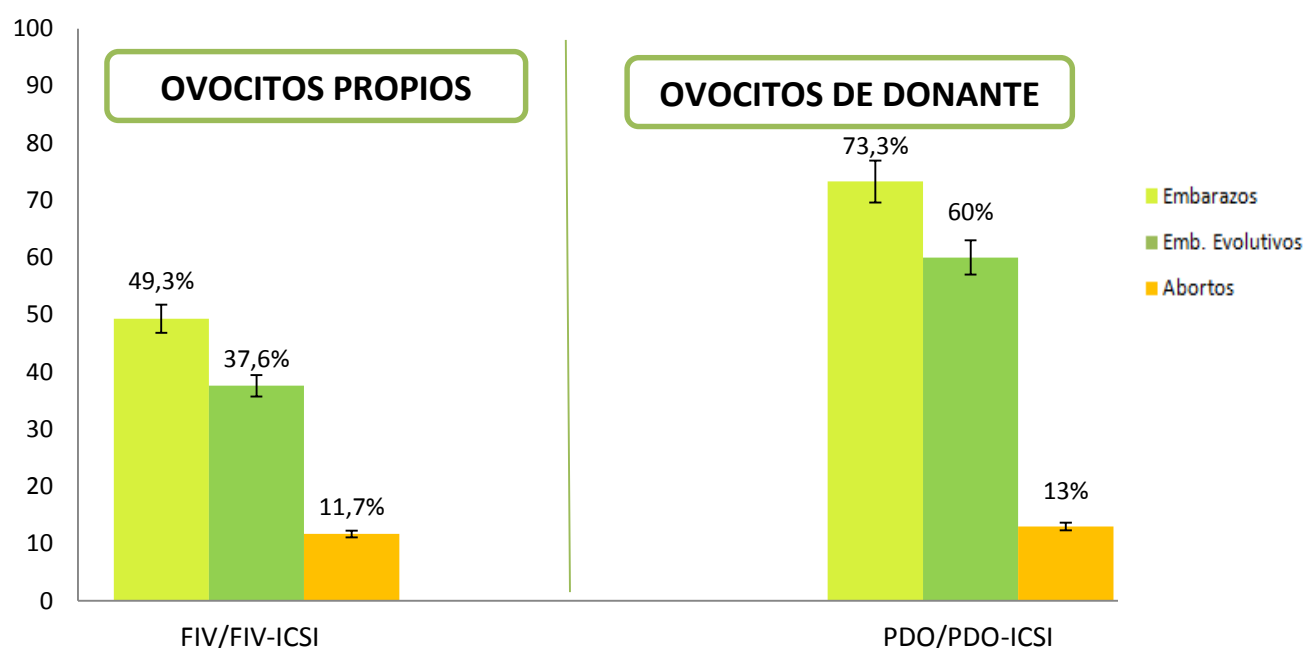
**Tabla 7:** Se incluyen los datos sobre ciclos totales, embarazos, embarazos evolutivos y abortos en el grupo B del estudio representado por pacientes con un FISH-e alterado a los que se les realiza SGE

	ÓVULOS PROPIOS	ÓVULOS DE DONANTE
	FIV/ICSI	PDO
<b>Ciclos</b>	77	15
<b>Embarazos</b>	38	11
<b>Embarazos evolutivos</b>	29	9
<b>Abortos</b>	9	2

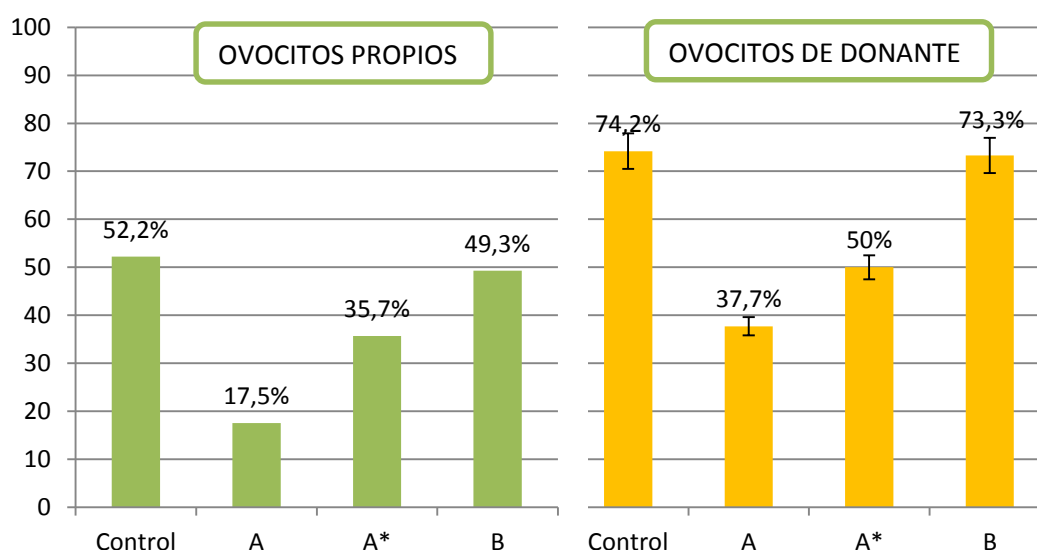
**Tabla 8:** Porcentajes de embarazos, embarazos evolutivos y abortos en pacientes del grupo B. La tasa de embarazo evolutivo y aborto se calcula en función del total de ciclos. Los valores marcados con (\*) se refieren al porcentaje en base al total de embarazos. (Los valores marcados con \*) representan el porcentaje de embarazo evolutivo y aborto, respectivamente, en función de los embarazos totales y no de los ciclos totales).

	ÓVULOS PROPIOS	ÓVULOS DE DONANTE
	FIV	PDO
<b>% Embarazos</b>	49,3%	73,3%
<b>%Embarazos evolutivos</b>	37,6% (76,3%)*	60% (81%)*
<b>%Abortos</b>	11,7% (23,7%)*	13% (18%)*

**Tabla 9:** Representación de los porcentajes de embarazo, embarazo evolutivo y aborto en pacientes con FISH-e alterado a los que se les ha realizado SGE



**Tabla 10:** Comparativa de las tasas de embarazo (clínico) entre los grupos separados entre óvulos propios y de donante:



Cuando comparamos los resultados obtenidos en los tres grupos estudio (Tabla 10), observamos cómo los porcentajes de embarazo en pacientes con el FISH-e alterado en los que no se realiza selección genética son considerablemente más bajos que el grupo control (Grupo A) mientras que los resultados del grupo B, consistente



en pacientes con el FISH-e alterado pero en los que sí se realiza selección genética, se asemejan bastante a los valores esperados en el grupo control pudiendo considerarse equiparables.

Por otro lado, observamos que en el subgrupo A\* (pacientes con FISH-e alterado en los que se realiza DGP) los porcentajes de embarazo son mejores que en el grupo A pero sin llegar al nivel del grupo control. Esto es debido al menor número de embriones viables y transferibles obtenidos por ciclo al no poder seleccionar el espermatozoides previamente a la fecundación y, en menor medida, por la agresividad de la técnica que requiere del biopsiado de una célula del embrión.

Puesto que al aplicar técnicas que reducen el número de espermatozoides con el DNA fragmentado en sémenes con una alta incidencia en aneuploidías aumentamos el número de embarazos y, por tanto, disminuimos el número de embriones aneuploides, podemos asumir que la fragmentación está altamente asociada a la presencia de aneuplodías.

Existen estudios que sugieren que la presencia de aneuplodías durante la maduración espermática puede derivar en la fragmentación del DNA espermático pero sin llegar a producir la apoptosis celular<sup>17</sup>. Por esto, la detección de marcadores preapoptóticos y de madurez puede ser un paso clave en la consecución de embriones sanos y con buen pronóstico reproductivo.

Por último, al comparar los resultados de ovocitos propios con los de ovocitos de donante podemos comprobar cómo en este segundo caso el porcentaje de embarazo es siempre mayor para todos los grupos. Esto podría sugerir un cierto papel corrector que los ovocitos de buena calidad como los de donantes jóvenes podrían hacer sobre los espermatozoides, reduciendo el número de aneuplodías y aumentando las tasas de embarazo.

## **6. CONCLUSIONES**

1. Queda demostrado el impacto negativo que tiene la presencia de aneuploidias en los espermatozoides en el éxito reproductivo de una pareja
2. La realización de técnicas de DGP permite mejorar los resultados pero sin llegar a ser equiparables a los del grupo control.
3. La realización de técnicas previas de SGE en pacientes con FISH alterado nos permite alcanzar tasas de embarazo equiparables a pacientes con FISH- e normal
4. Todo parece confirmar la relación existente entre la fragmentación del DNA espermático y la presencia de aneuploidías aunque esto precisa de posteriores estudios más avanzados
5. Parece confirmarse el papel corrector que puede ejercer sobre el espermatozoide óvulos de buena calidad como son los de las donantes.

## **6. CONCLUSIONS**

1. It is demonstrated the negative impact the presence of aneuploidy has in the spermatozoa related to the reproductive success of a couple.
2. Using DGP we could improve the results but they are still lower than the control group.
3. The utilization of sperm selection techniques in patients with an altered FISH-e allows us to reach similar pregnant rates than FISH-e normal patients.
4. Everything seems to confirm the relationship between DNA fragmentation and the presence of aneuploidy but later studies are required.
5. The corrector role that good quality oocytes can make over the spermatozoa seems to be suggested.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> F. Zegers-Hochschild et al. Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Versión revisada y preparada por el International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).2010
- <sup>2</sup> Rosario Tapia Serrano. Una visión actual de la infertilidad masculina.Rev Mex Reprod.2012;4(3)103-109
- <sup>3</sup> Teppa-Garrán, Alejandro D., and Anselmo Palacios-Torres. "Evaluación actual de la infertilidad masculina." Investigación Clínica 45.4 (2004).
- <sup>4</sup> World Health Organization. "WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen". 5º edition. 2010
- <sup>5</sup> Bonde, Jens Peter E., et al. "Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners." The Lancet 352.9135 (1998): 1172-1177.
- <sup>6</sup> Marnet, B., et al. "Computer-assisted assessment of sperm morphology: comparison with conventional techniques." International journal of andrology23.1 (2000): 22-28.
- <sup>7</sup> Parinaud, J., et al. "Influence of sperm parameters on embryo quality." Fertility and sterility 60.5 (1993): 888-892.
- <sup>8</sup> Katz, D. F., L. Diel, and J. W. Overstreet. "Differences in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa." Biology of reproduction 26.4 (1982): 566-570.
- <sup>9</sup> Carballo, Esperanza, et al. "El valor de la edad paterna en los resultados de inseminación intrauterina." Ginecol Obstet Mex 81 (2013): 329-333.
- <sup>10</sup> Donnelly, Eilish T., et al. "In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome." Fertility and sterility 70.2 (1998): 305-314.
- <sup>11</sup> World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 4º edition. 1999
- <sup>12</sup> Vendrell, X et al. Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients. Reproductive BioMedicine Online.
- <sup>13</sup> Larson, K. L., et al. "Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques."Human Reproduction 15.8 (2000): 1717-1722.
- <sup>14</sup> Larson-Cook et al. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. Fertil Steril. 2003; 80: 895-902

<sup>15</sup> Conrado Avendaño, M. Sc et al. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. Fertility and Sterility. Vol.91, No.4, April 2009

<sup>16</sup> Tesarik, Jan, Ermanno Greco, and Carmen Mendoza. "Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation." Human Reproduction 19.3 (2004): 611-615.

<sup>17</sup> Muriel, Lourdes, et al. "Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis." Journal of andrology 28.1 (2007): 38-49.