

Columnas de Anexinas V: fundamento bioquímico, riesgos y beneficios de su uso terapéutico

Dra. Vanesa Rawe

REPROTEC, Patología de Gametas y Embriones, Buenos Aires, ARGENTINA

vanesa.rawe@gmail.com

La siguiente disertación ha sido presentada en la última reunión anual de la Sociedad Argentina de Andrología, Noviembre, 2010. El presente texto es una modificación de la publicación realizada sobre el tema en la revista de ALMER, vol 6, numero 1, Pag 12-17, 2009.

Teniendo en cuenta la importancia que tiene el 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 la muestra de eyaculado. 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. Entre ellas podemos mencionar el uso de espermatozoides testiculares [del inglés: testicular sperm aspiration, TESA], la selección morfológica con alta magnificación [del inglés: Intracytoplasmic Morphologically-Selected Sperm Injection, IMSI®], la selección espermática luego del pegado al ácido hialurónico (PICSI®) y las Columnas de Anexinas V o MACS [del inglés: Magnetic Activated Cell Sorting ®].

Basándonos en nuestra propia experiencia y en datos reportados en la bibliografía, nos detendremos en el análisis de el uso de espermatozoides luego del pasaje por MACS®

En búsqueda de un método no invasivo que permita dar solución a los altos niveles de fragmentación del ADN y apoptosis celular en espermatozoides (Figura 1), distintos grupos de trabajo describieron el uso de Anexina V acoplada a pequeñas esferas metálicas recubiertas por polímero biodegradable (~50 nm en diámetro). Las mismas pueden ser usadas para separar espermatozoides muertos y apoptóticos cuando se los expone a un campo magnético de alto poder en una columna de afinidad. Este procedimiento de separación o filtrado molecular se denomina 'Magnetic-Activated Cell Sorting- MACS-' o Separación Magnética por Columnas de Anexina V. El principio consiste en que los espermatozoides con externalización de fosfatidilserina y membranas plasmáticas deterioradas se unirán Anexina V que, acopladas a las microesferas (Figura 2), 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 la columna (1-3). 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).

En un reciente estudio presentado en la Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva (4) y en el noveno Taller de la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida en Cancún, México, 2009 (5), pretendimos dar respuestas a las siguientes preguntas:

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

basales de las muestras?, 3.- ¿Se afecta la movilidad final luego del uso de las Columnas de Anexinas V? ¿Se afecta la sobrevivencia de la muestra?, 4.- ¿Se pueden lograr embriones con potencial de implantación luego de MACS durante el ICSI?

El protocolo empleado para separación de espermatozoides apoptóticos fue adaptado a partir de las sugerencias del proveedor (Death Cell Removal Kit, Miltenyi Biotec, Alemania).

Se analizaron pacientes varones con estudios previos de fragmentación de ADN espermático por la técnica de TUNEL con fluorescencia. Las muestras fueron procesadas por Gradiente (Isolate, Irvine Scientific, CA) y luego se realizó el pasaje por MACS. Se tomaron 3 poblaciones de espermatozoides: 1) Post gradiente (**fracción inicial**), 2) Eluida de MACS (**fracción negativa**), 3) Adherida a la matriz magnética (**fracción positiva**, ver Figura 2). En cada población se evaluó el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado por la técnica de TUNEL con fluorescencia, el porcentaje de espermatozoides con presencia de Caspasa 3 activa (Figura 1), la movilidad y la sobrevivencia (test de eosina).

Los resultados indican que la técnica es eficaz en la reducción del número de espermatozoides pre-apoptóticos y con el ADN fragmentado. De manera independiente a los valores de fragmentación espermática en la fracción inicial, luego del pasaje por MACS los niveles de daño del ADN disminuyen de manera significativa en la fracción negativa, mientras que la fracción positiva presentó altos niveles. Los valores de Caspasa 3 activa se redujeron de manera significativa en todas las muestras evaluadas alcanzando niveles de significancia estadística. En nuestro estudio, la movilidad decrece aproximadamente un 20% luego el pasaje por MACS y aunque de manera no estadísticamente significativa, la sobrevivencia se incrementa. En nuestra experiencia hasta es posible 'mejorar' muestras con niveles normales de fragmentación espermática y de esta manera 'enriquecer' a las muestras testeadas con espermatozoides no apoptóticos.

Hace unos años atrás, Grunewald y Glander [6,7] postularon que el método de Columnas de Anexinas V es realizable y seguro y que puede ser usado para proveer fracciones de espermatozoides de alta calidad. En el 2006, Said y cols. [8-10] usaron microscopía electrónica y probaron que la fracción negativa no tenía microesferas adheridas de manera inespecífica. Los mismos autores, [11] estudiaron 15 muestras de semen de hombres normales y compararon diferentes métodos de separación de espermatozoides no apoptóticos. Se usaron gradientes y lavados acoplados a Columnas de Anexinas V y se midieron los niveles de externalización de fosfatidilserina, potencial de membrana plasmática y niveles de caspasa 3 activa en las distintas poblaciones estudiadas (Fracción Inicial, Fracción Negativa y Fracción Positiva). Los autores mostraron mejorías en los niveles de movilidad, sobrevivencia, potencial de membrana mitocondrial y niveles de caspasa 3 activa luego del uso de Columnas de Anexinas V y gradientes. Basándose en esa experiencia preliminar, el mismo grupo de trabajo [8] utilizó 35 muestras de donantes normales y luego del pasaje de las muestras por Columnas de Anexinas V, lograron disminuir los niveles de caspasa 3 activa a aproximadamente la mitad de los iniciales y el potencial de membrana mitocondrial aumentó un 10% en promedio. En el mismo estudio, la fragmentación del ADN medido por la técnica de TUNEL pasa de un promedio \pm desvío estándar de $14,4 \pm 13,2\%$ a $9,7 \pm 10,6\%$ en la fracción Anexinas V negativa (eluido). Los autores plantean que se necesitan experimentos con pacientes infértiles y con modelos animales que evalúen la viabilidad y genética de los embriones antes de que la técnica se pueda usar en la clínica.

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

Para dar respuesta a las preguntas acerca del impacto en los resultados del ICSI que tiene el uso de los espermatozoides recuperados luego del pasaje por MACS, seleccionamos y estudiamos parejas sin factor femenino aparente. Realizamos ICSI empleando la fracción negativa de espermatozoides obtenida luego del uso de MACS y obtuvimos una tasa de embarazo clínico evolutivo por transferencia embrionaria= 30%. En todos los casos se transfirieron 2 embriones con al menos uno de buena calidad. En la actualidad, los tres embarazos evolutivos son niños nacidos sanos sin trastornos neonatales [12].

En el 2008, Dirican y cols. [13], evaluaron resultados con el uso de MACS e ICSI. En ese reporte se estudiaron 74 parejas en términos tasa de fecundación, clivaje embrionario e implantación. Los autores muestran mejorías en los porcentajes de espermatozoides con morfología normal pero no se detienen en el estudio de los niveles de apoptosis y fragmentación del ADN espermático. Como consecuencia, los resultados sólo se pueden evaluar de manera incompleta y la interpretación final es inconclusa.

El uso de espermatozoides no apoptóticos y el consecuente mejoramiento de muestras de espermatozoides al momento del ICSI debería impactar de manera positiva en los resultados de calidad embrionaria y embarazos evolutivos. Sakas y cols., 2005 [14] sugieren que el aporte del espermatozoide durante el proceso de fecundación es aproximadamente de un 10-15%. Cabe esperar entonces que las tasas de embarazos se incrementen en ese orden y que la maquinaria intracelular del oocito sea el 'cuello de botella' en este proceso. El aporte del gameto femenino es fundamental en este proceso ya que contiene todos los factores necesarios para la correcta remodelación de la cromatina masculina luego de la penetración intracitoplásmica.

Las muestras de pacientes infértiles deben ser consideradas en el contexto de la clínica que cada paciente presenta. En cada caso es importante diagnosticar la patología espermática subyacente incluyendo estudios ultraestructurales, de fragmentación del ADN y marcadores de apoptosis, junto con los trastornos andrológicos presentes que afecten la calidad espermática (varicocele, criptorquidia, infecciones, etc.) para de esa manera poder tomar medidas terapéuticas adecuadas.

Con mayor experiencia y un número elevado de casos de manera prospectiva y ramdomizada, será interesante investigar el impacto de esta tecnología en los resultados de técnicas de reproducción asistida. Hasta ahora los resultados son muy promisorios [12-15].

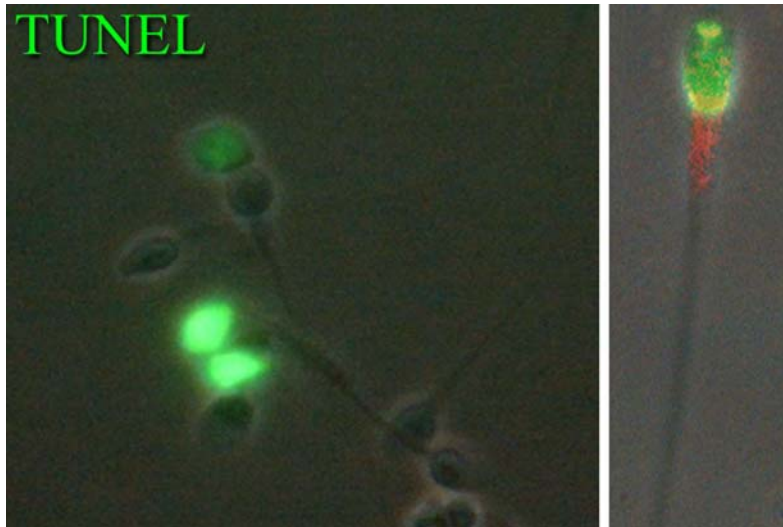


Figura 1. En el panel izquierdo se visualizan espermatozoides con un núcleo fragmentado (verde) y núcleos sanos (sin color). En el panel derecho se ve un espermatozoide con núcleo no homogéneo fragmentado (verde) y con presencia de caspasa 3 activa en la pieza media (rojo). La fragmentación del ADN y la presencia de caspasa 3 activa se midieron por la técnica de TUNEL e inmunocitoquímica respectivamente. Fuente: REPROTEC.

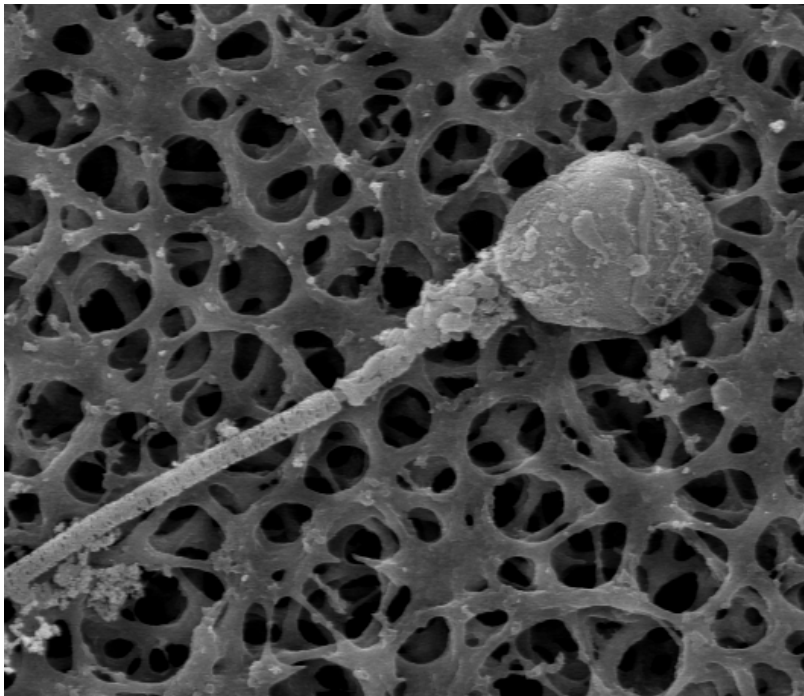


Figura 2 . Microscopía electrónica de barrido de la fracción positiva retenida luego del pasaje a través de MACS de una muestra con altos niveles de fragmentación del ADN (en el diagnóstico previo). La fracción negativa se utilizó para ICSI y en este caso el paciente logró embarazo. Fuente: CREA, Valencia, España y REPROTEC.

Referencias

1. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ y col. (2001) Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell and Tissue Banking*, 2:127-133.
2. Paasch U, Grunewald S, Fitzl G y col. (2003) Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24: 246-252.
3. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A y col. (2004) Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 81: 802-809.
4. Vanesa Rawe, Gustavo Álvarez, Heydy Uriondo, Sergio Papier, Sandra Miasnik, Florencia Nodar. Premio Figueroa Casas - Accesit Básico 2009. Separación magnética por columnas de anexinas V: filtrado molecular para la selección de espermatozoides no apoptóticos. *Reproducción 2009*; 24: 104-114.
5. ICSI con columnas de anexinas v para la selección de espermatozoides no apoptótico. 9º Taller de la REDLARA en Cancún, (México, Abril 2009), Libro de resúmenes 9ºTaller General, RT28, páginas 63-66.
6. Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, y col (2009) Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil Steril.*, 92(2):572-7.
7. Glander HJ y Schaller J (1999). Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod*, 5: 109-115.
8. Said T, Agarwal A, Grunewald S y col. (2006) Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod BioMed Online*, 3: 336-339.
9. Said T, Agarwal A, Grunewald S y col. (2006) Selection of Nonapoptotic Spermatozoa As a New Tool for Enhancing Assisted Reproduction Outcomes: An In Vitro Model. *Biol Reprod.*, 74: 530-537.
10. Said T, Agarwal A, Zborowski M y col. (2008) Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl.*, 2: 134-42.

11. Said T, Grunewald S, Paasch U y col. (2005) Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques *Reprod BioMed Online*, 6: 740–746.

12. Rawe V, Boudri HU, Alvarez-Sedo C, Carro M, Papier S, Nodar F (2010) Healthy baby born after after reduction of sperm ADN fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod BioMed Online*, 20:320-323.

13. Dirican, E.K., Ozgun, O.D., Akarsu, S., et al., (2008) Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J. Assist. Reprod. Genet.* 25, 375–381.

14. Seli and Sakkas (2005) Spermatozoa nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Human Reproduction Update*, vol11, N4, 337-349

15. Polak de Fried E, Denaday F. (2010) Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertil Steril*. Feb 9. [Epub ahead of print].