



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN UROLOGÍA
“INSTITUTO DOCENTE DE UROLOGÍA”



**SELECCIÓN ESPERMÁTICA MEDIANTE EL USO DE LAS COLUMNAS DE
ANEXINA V vs LOS MÉTODOS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA
CONVENCIONALES EN PACIENTES ASTENOTERATOZOOSPÉRMICOS
SOMETIDOS A TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

Trabajo Especial de Grado presentado como requisito parcial para la
Obtención del Título de Especialista en Urología.

Autor: Dra. Marilyn Gutiérrez Fernández

Tutor Clínico: Dr. Rafael Cuervo Arias

Tutor Metodológico: Dr. Amílcar Pérez Rivero

Valencia, Noviembre 2018



ACTA DE DISCUSIÓN DE TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

En atención a lo dispuesto en los Artículos 127, 128, 137, 138 y 139 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 135 del citado Reglamento, para estudiar el Trabajo Especial de Grado titulado:

SELECCIÓN ESPERMÁTICA MEDIANTE EL USO DE LAS COLUMNAS DE ANEXINA V VS LOS MÉTODOS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICAS CONVENCIONALES EN PACIENTES ASTENOTERATOZOOSPÉRMICOS SOMETIDOS A TÉCNICA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDAS. INSTITUTO DOCENTE DE UROLOGÍA, VALENCIA CARABOBO 2011 - 2017

Presentado para optar al grado de **Especialista en Urología** por el (la) aspirante:

GUTIERREZ F., MARILYN DEL V
C.I. V – 14251053

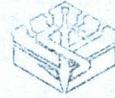
Habiendo examinado el Trabajo presentado, bajo la tutoría del profesor(a): Rafael Cuervo C.I. 7091491, decidimos que el mismo está **APROBADO**.

Acta que se expide en valencia, en fecha: **27/05/2019**


Prof. Rafael Cuervo (Pdte)
C.I. 7091491
Fecha 27/05/2019


Prof. Manuel Rey
C.I. 4137482
Fecha 27-05-2019
TG: 134-18


Prof. Pablo Sánchez
C.I. 6093785
Fecha 27-05-2019



TC-CS: 134-18

ACTA DE CONSTITUCIÓN DE JURADO Y DE APROBACIÓN DEL TRABAJO

Quienes suscriben esta Acta, Jurados del Trabajo Especial de Grado titulado:

"SELECCIÓN ESPERMÁTICA MEDIANTE EL USO DE LAS COLUMNAS DE ANEXINA V VS LOS MÉTODOS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICAS CONVENCIONALES EN PACIENTES ASTENOTERATOZOOSPÉRMICOS SOMETIDOS A TÉCNICA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDAS. INSTITUTO DOCENTE DE UROLOGÍA, VALENCIA CARABOBO 2011 - 2017" Presentado por el (la) ciudadano (a): **GUTIERREZ F., MARILYN DEL V** titular de la cédula de identidad N° **V-14251053**, Nos damos como constituidos durante el día de hoy: 20-05-2019 y convenimos en citar al alumno para la discusión de su Trabajo el día: 27-05-2019

RESOLUCIÓN

Aprobado: Fecha: 27-05-2019 reprobado: Fecha: _____

Observación: _____

Presidente del Jurado
Nombre: RAFAEL CUERVO

C.I. 7091491

Miembro del Jurado
Nombre: Harold Rey

C.I. 4137482

Miembro del Jurado
Nombre: Pablo Sanchez

C.I. 6093785

Nota:

1. Esta Acta debe ser consignada en la Dirección de Asuntos Estudiantiles de la Facultad de Ciencias de la Salud (Sede Carabobo), inmediatamente después de la constitución del Jurado y/o de tener un veredicto definitivo, debidamente firmada por los tres miembros, para agilizar los trámites correspondientes a la elaboración del Acta de Aprobación del Trabajo.
2. *En caso de que el Trabajo sea reprobado, se debe anexar un informe explicativo, firmado por los tres miembros del Jurado.

INDICE GENERAL

Portada	i
Índice General.....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Introducción.....	1
Materiales y Métodos.....	7
Resultados.....	9
Discusión.....	13
Conclusiones.....	15
Recomendaciones.....	17
Referencias.....	18
Anexos.....	21



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN UROLOGÍA
“INSTITUTO DOCENTE DE UROLOGÍA”



SELECCIÓN ESPERMÁTICA MEDIANTE EL USO DE LAS COLUMNAS DE ANEXINA V vs LOS MÉTODOS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA CONVENCIONALES EN PACIENTES ASTENOTERATOZOOSPÉRMICOS SOMETIDOS A TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Autor: Dra. Marilyn Gutiérrez F.
Tutor Clínico: Dr. Rafael Cuervo A.
Tutor Metodológico: Dr. Amilcar Pérez R

RESUMEN

Los avances tecnológicos en el área de la medicina reproductiva han desarrollado técnicas de reproducción asistida que han logrado resolver algunos de los problemas asociados con la infertilidad, entre ellos, los atribuidos al factor masculino, que con frecuencia se debe a alteraciones de los espermatozoides, de tal manera que para que esta población pueda ser apta para fertilizar el gameto femenino, se propone el uso de un método de selección de espermatozoides libres de daño apoptótico, como el uso de columnas de Anexina V. **Objetivo General:** Comparar los resultados de la selección espermática mediante el uso de las columnas de Anexina V vs los métodos de selección espermática convencional en pacientes astenoteratozoospermicos sometidos a Técnicas de Reproducción Asistida que acudieron a CEVALFES en el Instituto Docente de Urología (IDU) durante los años 2011-2017. **Metodología:** se trata de un estudio de tipo observacional descriptivo de nivel comparativo, con un diseño no experimental, transversal y retrospectivo. La recolección de datos se realizó a través de la revisión documental y como instrumento se diseñó una ficha de registro. Los resultados se presentaron en tablas de asociación. **Resultados:** Fueron más frecuentes aquellos pacientes con un tiempo de diagnóstico de la Infertilidad menor a 10 años (75,61%), siendo el tiempo predominante en ambos grupos de estudio. Existieron más pacientes con presencia de comorbilidades (65,85%), presentándose en similar proporción en ambos grupos de estudio, siendo la comorbilidad más frecuente la Obesidad (36,58%= 15 casos), la cual fue la más frecuente en ambos grupos. Sólo 8 pacientes refirieron antecedente de trastornos hormonales que alteraban la espermatogénesis (19,51%), siendo las alteraciones más frecuentes: Hiperprolactinemia (5 casos) y Déficit de testosterona (3 casos). De los antecedentes urológicos presentados por los sujetos incluidos en la muestra se tiene que el más frecuente fue la prostatitis (31,71%), seguido de la varicocelectomía (29,27%). La Astenoteratozoospermia Severa fue la alteración más frecuente en el espermograma (53,66%). En el grupo que se utilizó la separación con columnas de Anexina V el porcentaje de embarazos positivos fue levemente mayor que en el método de selección convencional, sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes ($P > 0,05$)

Palabras Clave: Infertilidad. Espermograma. Técnicas de Reproducción Asistida. Columnas de Anexina V.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN UROLOGÍA
“INSTITUTO DOCENTE DE UROLOGÍA”



**SPERMATAL SELECTION THROUGH THE USE OF ANEXIN V COLUMNS VS
THE CONVENTIONAL SPERMATAL SELECTION METHODS IN PATIENTS
ASTENOTERATOZOOSPÉRMICOS SUBMITTED TO ASSISTED
REPRODUCTION TECHNIQUES**

ABSTRACT

Technological advances in the area of reproductive medicine have developed techniques of assisted reproduction that have managed to solve some of the problems associated with infertility, including those attributed to the male factor, which is often due to alterations in sperm, so that for this population to be able to fertilize the female gamete, we propose the use of a sperm selection method free of apoptotic damage, such as the use of Annexin V columns. General Objective: Compare the results of the selection sperm through the use of Annexin V columns vs conventional sperm selection methods in astenoteratozoospermic patients undergoing Assisted Reproduction Techniques that attended CEVALFES in the Teaching Institute of Urology (IDU) during the years 2011-2017. Methodology: this is a descriptive observational study of a comparative level, with a non-experimental, transversal and retrospective design. The data collection was done through the documentary review and as a tool a registration form was designed. The results were presented in association tables. Results: Those patients with a time of diagnosis of Infertility less than 10 years (75.61%) were more frequent, being the predominant time in both groups of study. There were more patients with comorbidities (65.85%), presenting a similar proportion in both study groups, with the most frequent comorbidity being Obesity (36.58% = 15 cases), which was the most frequent in both groups. Only 8 patients reported a history of hormonal disorders that altered spermatogenesis (19.51%), the most frequent alterations being: Hyperprolactinemia (5 cases) and Testosterone deficiency (3 cases). Of the urological background presented by the subjects included in the sample, the most frequent was prostatitis (31.71%), followed by varicocelectomy (29.27%). The Severe Astenoteratozoospermia was the most frequent alteration in the spermogram (53.66%). In the group that used the separation with Annexin V columns, the percentage of positive pregnancies was slightly higher than in the conventional selection method; however, no statistically significant difference was found between the percentages ($P > 0.05$).

Keywords: Infertility. Spermogram Assisted Reproduction Techniques. Columns of Annexin V.

INTRODUCCIÓN

Se denomina infertilidad conyugal a aquellas parejas que no logran concebir por un periodo de 12 meses o más y esto ocurre en aproximadamente un 15% de las mismas. Lo cual conlleva a daños psicológicos y gastos importantes en terapias y tratamientos de fertilidad, inclusive por largo tiempo. (1)

La intención de concebir se ha ido solucionando en parte por el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida (en adelante TRA), aunque a pesar de los logros alcanzados todavía existe en alto porcentaje de casos en los que estas técnicas no son del todo efectivas. (2) La responsabilidad de éxito esta compartida entre ambos miembros de la pareja. Los gametos femeninos son el factor limitante ante cualquier técnica de reproducción ya que se generan muy pocos. Sin embargo, los espermatozoides pueden variar en números desde millones hasta cero. (3) La infertilidad originada por el factor masculino es una de las causas que afectan con mayor frecuencia el éxito de las TRA (4). Los factores que pueden afectar la capacidad reproductiva del varón son: alteraciones en los espermatozoides, trastornos hormonales, anomalías genéticas, enfermedades e infecciones del sistema reproductor masculino y factores externos como ciertos medicamentos, así como el tabaquismo, el estrés y el consumo de alcohol y drogas ilícitas. (5-6-7)

Las técnicas actuales de selección de espermatozoides se basan fundamentalmente en la movilidad a través del swim up o de la centrifugación por gradientes de densidad. Sin embargo, la evaluación macro y microscópica se ha venido acompañado del conocimiento continuo de procesos bioquímicos y moleculares que regulan la producción de los espermatozoides más aptos para fertilizar. Distintos marcadores moleculares o procesos están implicados en la infertilidad asociada al factor masculino, como, por ejemplo: la apoptosis, la fragmentación del ADN, el estrés oxidativo, la ubiquitina, los receptores de ácido hialurónico, etc.(8)

Aún subsiste el amplio borde de optimizar las TRA, y una de las formas de llevar esta mejora es escogiendo objetivamente los espermatozoides más aptos para lograr el éxito reproductivo. Diferentes alternativas tecnológicas pueden ser útiles para seleccionar o separar células espermáticas con ciertas características moleculares o estructurales, de tal manera que continúen su viabilidad posterior y mejoren los resultados finales.(9) Como parte de las TRA dirigidas a daños espermáticos importantes se desarrolló la Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y a partir de ésta surge la Inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionado morfológicamente (IMSI), que consiste en el análisis en tiempo real de la ultra-estructura del gameto masculino vivo, usando un microscopio particularmente equipado. (10)

Sin embargo, el objetivo principal de estas técnicas de reproducción asistida es obtener un número suficiente de espermatozoides viables y móviles capaces de fecundar un ovocito. Las técnicas actuales de la selección de espermatozoides se basan básicamente en la morfología por criterio del embriólogo en los procedimientos de micromanipulación, o bien en la autoselección de los espermatozoides por su viabilidad o movilidad, donde se destacan la centrifugación por gradientes de densidad que elimina en plasma seminal y otros constituyentes del fluido seminal dejando solo espermatozoides maduros viables. O bien mediante el swim up, la cual se basa en la que sólo los espermatozoides de buena movilidad podrán ascender al sobrenadante. Con ambas técnicas se pueden obtener gametos masculinos fecundantes, son métodos sencillos, de bajo costo y rápidos, aunque solo debería usarse como complemento de métodos más fisiológicos. (11)

Es evidente que hoy día, deben utilizarse métodos de selección espermáticos basados en la fisiología y el estado funcional de los espermatozoides, entre ellos surge la separación magnética por columnas de Anexina V, MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) la cual se trata de una selección inmunomagnética,

utilizada clínicamente con éxito en distintos ámbitos. En el campo de la reproducción se utilizó inicialmente para seleccionar y caracterizar a los espermatozoides acrosoma reaccionados, para separar distintas células dentro de una población o aislar leucocitos, no obstante, sus mejores ejemplos vienen dados por el aislamiento de células progenitoras raras de sangre de cordón umbilical y el uso de sangre periférica para sustituir a la medula ósea para el trasplante en pacientes tras quimioterapia o radioterapias. Se basa en el uso de MicroBeads (MB) que son partículas supermagnéticas de aproximadamente 50 nanómetros de diámetro, conjugadas con proteínas o anticuerpos específicos para su unión a las células o marcadores de interés. Requieren unas columnas para separar físicamente las células en función si están o no marcadas gracias a un intenso campo magnético creado en la matriz de la columna, suficiente para retener las células unidas con una mínima cantidad de MB, mientras que las células no unidas pasan a través de la columna y pueden ser recogidas. Usando esta tecnología podríamos obtener espermatozoides con una calidad superior en términos de movilidad, viabilidad y marcadores apoptóticos. (12)

Por todo lo anteriormente planteado se estableció como *Objetivo General* del presente estudio: Comparar los resultados de la selección espermática mediante el uso de las columnas de Anexina V vs los métodos de selección espermática convencional en pacientes astenoteratozoospermicos sometidos a Técnicas de Reproducción Asistida que acudieron a CEVALFES en el Instituto Docente de Urología (IDU) durante los años 2011-2017.

Para lo cual se establecieron los siguientes *Objetivos específicos*: Clasificar a los pacientes con Infertilidad debido a factor masculino de acuerdo al grupo etario, años de infertilidad, presencia de comorbilidades y antecedente del uso de técnicas de reproducción asistida y la cantidad de las mismas. Describir la presencia de algún trastorno hormonal que afecte la espermatogénesis, definir el grado de astenoteratozoospermia y otro antecedente urológico presente en los sujetos que conformaron la muestra. Caracterizar la tasa de embarazo posterior a

la aplicación de separación espermática con columnas de Anexina V vs la separación espermática convencional.

En cuanto a los trabajos realizados que guardan relación directa con el presente estudio se encuentra el realizado inicialmente por Rawe, Alvarez y cols en el año 2009, quienes realizaron el estudio titulado: Separación magnética por columnas de Anexina V: “filtrado molecular” para la selección de espermatozoides no apoptóticos”, tuvo como objetivo general: Optimizar la integración de MACS y probar su eficacia en la remoción de espermatozoides apoptóticos, estudio descriptivo/experimental, en la que se analizaron 18 muestras de semen, en las que concluyeron que el uso de las columnas de anexina V no afecta la sobrevivencia ni la movilidad del espermatozoide y es muy efectivo en la remoción de espermatozoides apoptóticos Este novedoso método demuestra la ventaja de la filtración molecular en la separación de espermatozoides apoptóticos, lo cual podría optimizar los resultados de técnicas de reproducción asistida.(5)

Por su parte, Barroso Villa y cols en el 2012, realizan el estudio titulado: *Efectos de la aplicación de columnas de anexina en los resultados reproductivos de parejas infértiles*. El objetivo de esta investigación fue comparar la selección espermática solo mediante swim up o en combinación con la técnica de Columnas de anexina V en pacientes infértiles cuya muestra seminal se utilizó para técnica de reproducción asistida de alta complejidad (ICSI) con la tasa de fertilización y desarrollo embrionario. Se trató de un estudio piloto realizado a 11 parejas en quienes la muestra seminal se dividió en 2 grupos: (grupo A: seleccionada mediante swim up), (grupo B: seleccionada por swim up y columnas de anexina V). Con la población seminal obtenida se realizó ICSI y para cada grupo se evaluó la tasa de fertilización, desarrollo embrionario y fragmentación. En cuanto a los resultados, el porcentaje de fertilización fue de 83.3 vs 93.9 % para los grupos A y B respectivamente. (6)

Por su parte, Barroso y cols en el año 2012 publicaron el artículo titulado: "Efecto de la aplicación de columnas de Anexina V en los resultados reproductivos de parejas infértiles", donde compararon la selección espermática solo mediante swim up o en combinación con las columnas de anexina, se trató de un estudio retrospectivo en el que la tasa de fertilización fue de 83.3 vs 93.3% respectivamente. Concluyendo que en la actualidad está claro que la selección espermática mediante MACS disminuye la población espermática con daño apoptótico temprano; sin embargo, es necesario realizar un estudio clínico para determinar diferencias significativas en la tasa de fertilización, desarrollo embrionario, tasa de implantación y tasa de embarazo.(6)

En el año 2014 De Arriba presentó el trabajo denominado: "Apoptosis espermática en pacientes de TRA y columnas de Anexina", donde se evaluó el efecto de las columnas de anexina sobre las muestras capacitadas antes y después de ser filtradas, estudio retrospectivo, en el que los resultados obtenidos demuestran una reducción notable de los niveles de apoptosis espermática, pasando de 22,68% (muestra en fresco) y 16,17% (muestra capacitada) a 7.42% (muestra post Columnas de Anexina V). (7)

Por su parte, Portella y Sepúlveda en el trabajo titulado: "Evaluación del factor masculino en reproducción asistida: nuevas tecnologías." detallan las diferentes técnicas de selección espermática en TRA, entre ellas la separación por columnas de anexina V; se trató de un estudio descriptivo y retrospectivo, cuya conclusión fue que deben ser utilizados en pacientes con fallas previas en TRA, ya que optimiza la calidad del espermatozoide. (8)

En el año 2017, Lobo presentó la tesis doctoral titulada: "Relación entre la incorporación de las técnicas de separación espermática con columnas de anexina V (MACS), en la muestra seminal y los resultados en los tratamientos de reproducción asistida" comparan el uso de las técnicas clásicas de separación espermática a través de gradientes de densidad junto con MACS. Fue un estudio

prospectivo y no randomizado, que concluyo que la tasa de fecundación es más alta en el grupo MACS. (14)

Todas las características apoptoticas que se han identificado en los espermatozoides del eyaculado humano, pueden afectar significativamente el resultado de las TRA, y esto puede verse reflejado en bajas tasas de fecundación, pobre desarrollo embrionario y aborto recurrente. De toda esta información recopilada surge la necesidad de buscar estrategias que permitan reducir el número de espermatozoides apoptoticos con el fin de optimizar los resultados de las TRA, entre ellas el uso de las columnas de anexina V, las cuales pueden ser usadas para aislar células con externalización de fosfatidilserina (PS), y por tanto, separar espermatozoides con apoptosis temprana cuando son expuestos a un campo magnético de alto poder en una columna. Este procedimiento se llama Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) o Separación Magnética por Columnas de Anexina V.

En este sentido, esta investigación pretende realizar investigaciones propias que permitan reducir el alto porcentaje de espermatozoides apoptoticos con el fin de optimizar los resultados de la FIV (ICSI/IMSI), a través del uso de las Columnas de Anexina V como método de selección espermática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de una investigación de tipo Descriptivo, pues busca especificar propiedades características y rasgos importantes de cualquier fenómeno que se analice, ya que describe tendencias de un grupo o población (15). En este sentido, el estudio se basó en la observación, descripción y análisis del fenómeno de interés, en este caso, representado por el uso de Columnas de Anexina V para la selección de Espermatozoides en técnicas de reproducción asistida.

El diseño adoptado para el presente estudio fue el no experimental, ya que se evaluó de forma sistemática los grupos de estudio, tal y como se presentan en su contexto real y en un tiempo determinado, para luego compararlos entre sí (15). En este mismo sentido, según la temporalidad la investigación fue de tipo transversal – retrospectivo, puesto que los eventos de interés se observaron en el transcurso de un período de tiempo establecido en el pasado (16).

La población estuvo representada por la totalidad de pacientes que consultan por infertilidad, atribuida al factor masculino, atendidos en la consulta de Urología de Cevalfes en el Instituto Docente de Urología durante los años 2011 – 2017 y que solicitaron de forma voluntaria técnicas de Reproducción Asistida de alta complejidad. La muestra fue de tipo no probabilística, deliberada, representada 41 pacientes con diagnóstico de infertilidad atribuida al factor masculino, divididos en dos grupos: 23 sujetos que recibieron selección espermática convencional y 18 sujetos triple selección espermática, incluida el uso de las columnas de Anexina V.

Una vez obtenida la permisología necesaria para la realización del estudio por parte del comité de investigación y bioética de Cevalfes en el Instituto Docente de Urología, para la recolección de los datos se utilizó la técnica de la revisión documental, que consiste en obtener información de historias clínicas, que posteriormente fueron analizados y conformaron la muestra final (17). Como instrumento se diseñó una ficha de registro, la cual contiene un listado de

variables a investigar, las mismas presentan sus respectivos espacios en blanco donde se objetivó la información necesaria como resultado de la revisión de las historias clínicas (18).

Para el procesamiento y análisis de datos, se sistematizaron los mismos en una base de datos en Microsoft ® Excel, para luego analizarlos con las técnicas de estadística descriptiva univariada a partir de tablas y gráficos según los objetivos específicos. Se compararon los porcentajes de embarazos efectivos según las técnicas analizadas mediante la prueba Z de diferencia entre porcentaje. Todo se realizó a partir del procesador estadístico Statgraphics Plus 5.1.

RESULTADOS

De los 41 sujetos Astenoteratozoospermicos incluidos en la muestra se registró una edad promedio de 40,39 años \pm 0,79, con una mediana de 40 años, una edad mínima de 33 años, una edad máxima de 58 años y un coeficiente de variación de 13% (serie homogénea entre sus datos). Predominaron aquellos pacientes menores de 45 años (85,37%= 35 casos)

TABLA N° 1
CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON INFERTILIDAD DEBIDO A FACTOR MASCULINO. PACIENTES SOMETIDOS A TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA QUE ACUDIERON A CEVALFES EN EL INSTITUTO DOCENTE DE UROLOGÍA (IDU) AÑOS 2011-2017

Grupo	Anexina V		convencional (DS)		Total	
	f	%	f	%	f	%
Edad (años)						
<45	15	36,59	20	48,78	35	85,37
≥45	3	7,32	3	7,32	6	14,63
$\bar{X} \pm Es$	41,11 +/- 3,16		39,83 +/- 1,65		40,39 \pm 0,79	
Tiempo de diagnóstico de Infertilidad (años)	f	%	f	%	f	%
< 10	13	31,71	18	43,90	31	75,61
≥ 10	5	12,20	5	12,20	10	24,39
Comorbilidades	f	%	f	%	f	%
Si	11	26,83	16	39,02	27	65,85
No	7	17,07	7	17,07	14	34,15
Total	18	43,90	23	56,10	41	100
Tipo de comorbilidad	f	%	f	%	f	%
Obesidad	7	17,07	8	19,51	15	36,58
Sx metabólico	3	7,32	5	12,20	8	19,51
HTA	1	2,44	5	12,20	6	14,63
VPH	3	7,32	1	2,44	4	9,76
Depresión	1	2,44	0	0	1	2,44

Fuente: Datos Propio de la Investigación (Gutiérrez; 2018)

Un 56,10% de los pacientes recibieron la técnica de reproducción asistida convencional (23 casos), mientras que un 43,90% recibieron TRA con selección con columnas de Anexina V (18 casos). En ambos grupos de estudio predominaron los pacientes con menos de 45 años y no se encontró una

diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de edad según los grupos de estudio ($t = 0,80$; $P = 0,4265 > 0,05$)

A nivel muestral fueron más frecuentes aquellos pacientes con un tiempo de diagnóstico de infertilidad menor a 10 años ($75,61\% = 31$ casos), siendo el tiempo predominante en ambos grupos de estudio: Anexina V ($13/18$) y selección convencional ($18/23$)

A nivel muestral fueron más frecuentes aquellos pacientes con presencia de comorbilidades ($65,85\% = 27$ casos), presentándose en similar proporción en ambos grupos de estudio: Anexina V ($11/18$) y selección convencional ($16/23$)

Siendo la comorbilidad más frecuente la Obesidad ($36,58\% = 15$ casos), la cual fue la más frecuente en ambos grupos. En segundo lugar, se presentó el Síndrome metabólico (8 casos) y en tercer lugar la HTA (6 casos).

TABLA N° 2
PRESENCIA DE TRASTORNO HORMONAL QUE AFECTE LA
ESPERMATOGÉNESIS, EL GRADO DE ASTENOTERATOZOOSPERMIA Y
OTRO ANTECEDENTE UROLÓGICO. PACIENTES SOMETIDOS A TÉCNICAS
DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA QUE ACUDIERON A CEVALFES EN EL
INSTITUTO DOCENTE DE UROLOGÍA (IDU) AÑOS 2011-2017

Grupo	Anexina V		DS		Total	
Trastornos hormonales que alteren las espermatogénesis	f	%	f	%	f	%
Si	3	7,32	5	12,20	8	19,51
No	15	36,59	18	43,90	33	80,49
Antecedentes urológicos	f	%	f	%	f	%
Prostatitis	5	12,20	8	19,51	13	31,71
Varicocelelectomía	5	12,20	7	17,07	12	29,27
Epididimitis	4	9,76	3	7,32	7	17,07
Crecimiento prostático no obstructivo	1	2,44	0	0	1	2,44
Criptorquidia	1	2,44	0	0	1	2,44
Ausente	2	4,88	5	12,20	7	17,07
Grado de ATZ	f	%	f	%	f	%
Leve	2	4,88	3	7,32	5	12,20
Moderado	6	14,63	8	19,51	14	34,15
Severa	10	24,39	12	29,27	22	53,66
Total	18	43,90	23	56,10	41	100

Fuente: Datos Propio de la Investigación (Gutiérrez; 2018)

En sólo 8 pacientes se describió antecedente de trastornos hormonales que alteraban la espermatogénesis (19,51%), siendo las alteraciones más frecuentes: Hiperprolactinemia (5 casos) y Déficit de testosterona (3 casos).

De los antecedentes urológicos presentados por los sujetos incluidos en la muestra se tiene que el más frecuente fue la prostatitis con un 31,71% (13 casos), seguido de la varicocelelectomía (29,27%= 12 casos) y en tercer lugar la epididimitis (7 casos)

El grado de astenoteratozoospermia más frecuente fue la severa con un 53,66% (22 casos), siendo la más frecuente en ambos grupos de estudio: Anexina V (10/18) y selección convencional (12/23)

TABLA N° 3
CARACTERIZACIÓN DE LA TASA DE EMBARAZO POSTERIOR A LA
APLICACIÓN DE SEPARACIÓN ESPERMÁTICA CON COLUMNAS DE
ANEXINA V VS LA SEPARACIÓN ESPERMÁTICA CONVENCIONAL.
PACIENTES SOMETIDOS A TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA QUE
ACUDIERON A CEVALFES EN EL INSTITUTO DOCENTE DE UROLOGÍA (IDU)
DURANTE LOS AÑOS 2011-2017

Grupo	Anexina V		Selección convencional DS		Total	
	f	%	f	%	f	%
Embarazo Positivo	14	77,78	17	73,91	31	75,61
Embarazo Negativo	4	22,22	6	26,08	10	24,39
Total	18	100	23	100	41	100

Fuente: Datos Propio de la Investigación (Gutiérrez; 2018)

En el grupo que se utilizó la separación con columnas de Anexina V el porcentaje de embarazos positivos fue de 77,78% (14 casos), mientras que en el grupo donde se utilizó el método de selección convencional el porcentaje de embarazos positivos fue de 73,91% (17 casos). Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de embarazos efectivos ($Z=0,29$; $P=0,7718 > 0,05$)

DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó en Cevalfes (Centro Valenciano de Fertilidad y Esterilidad) en el Instituto Docente de Urología, durante los años 2011-2017. Realizando Fertilización in Vitro en pacientes con Diagnóstico de Infertilidad que ameritaban técnicas de Reproducción Asistida.

La calidad seminal se considera uno de los factores determinantes en el éxito de las TRA, cuya metodología rutinaria se basa fundamentalmente en el análisis de los parámetros seminales, especialmente los niveles de concentración, movilidad y morfología, así como en la separación espermática que presentan mayor movilidad. Sin embargo, estas técnicas convencionales proporcionan información de primera mano de las particularidades del eyaculado y resultan en la selección de un número adecuado de espermatozoides móviles, pero no permiten la evaluación de fenómenos moleculares y fisiológicos como la apoptosis espermática.

De los 41 sujetos astenoteratozoospermicos incluidos en la muestra se registró una edad promedio de 40,39 años \pm 0,79, con una mediana de 40 años, una edad mínima de 33 años, una edad máxima de 58 años y un coeficiente de variación de 13% (serie homogénea entre sus datos). Predominaron aquellos pacientes menores de 45 años (85,37%= 35 casos). Lo que concuerda con la mayoría de las publicaciones que estudian esta patología, evaluando factor masculino asociado a infertilidad. Lo cual guarda cierta semejanza con Barroso, en cuya investigación evidencio edad promedio del factor masculino 36 ± 5.5 años de edad. (6)

Un 56,10% de los pacientes recibieron técnicas de separación espermática convencional (23 casos), mientras que un 43,90% recibieron separación espermática con columnas de Anexina V (18 casos). En ambos grupos de estudio predominaron los pacientes con menos de 45 años y no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de edad según los grupos de estudio ($t = 0,80$; $P = 0,4265 > 0,05$)

A nivel muestral fueron más frecuentes aquellos pacientes con un tiempo de diagnóstico de Infertilidad menor a 10 años (75,61%=31 casos), siendo el tiempo predominante en ambos grupos de estudio: Anexina V (13/18) y selección convencional (18/23)

A nivel muestral fueron más frecuentes aquellos pacientes con presencia de comorbilidades (65,85%= 27 casos), presentándose en similar proporción en ambos grupos de estudio: Anexina V (11/18) y selección convencional (16/23)

Siendo la comorbilidad más frecuente la Obesidad (36,58%= 15 casos), la cual fue la más frecuente en ambos grupos. En segundo lugar, se presentó el Sx metabólico (8 casos) y en tercer lugar la HTA (6 casos).

Sólo 8 pacientes refirieron antecedente de trastornos hormonales que alteraban la espermatogénesis (19,51%), siendo las alteraciones más frecuentes: Hiperprolactinemia (5 casos) y Déficit de testosterona (3 casos).

De los antecedentes urológicos presentados por los sujetos incluidos en la muestra se tiene que el más frecuente fue la prostatitis con un 31,71% (13 casos), seguido de la varicocelectomía (29,27%= 12 casos) y en tercer lugar la epididimitis (7 casos)

El grado de astenoteratozoospermia más frecuente fue la severa con un 53,66% (22 casos), siendo la más frecuente en ambos grupos de estudio: Anexina V (10/18) y selección convencional (12/23). El cual guarda semejanza con la investigación de Tapia Serrano (19), cuyo grado de Astenoteratozoospermia Severa fue la más común en pacientes a quienes se les aplicaron TRA.

En el grupo que se utilizó la separación con columnas de Anexina V el porcentaje de embarazos positivos fue de 77,78% (14 casos), mientras que en el grupo donde se utilizó el método de selección convencional el porcentaje de embarazos positivos fue de 73,91% (17 casos). Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de embarazos efectivos ($Z=0,29$; $P=0,7718 > 0,05$). Lo cual concuerda con Ballester (20), quienes no encontraron diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos de estudio. Sin embargo Barroso (6), Diricam (12), Lobo Garcia (14) aplicaron exitosamente la técnica MACS y su porcentaje de embarazos fue mayor que con las técnicas de separación espermática convencionales.

CONCLUSIONES

Finalmente, los datos encontrados en la literatura concuerdan con los obtenidos en esta investigación y nos indican que la técnica de las columnas de anexina V son repetibles con eficacia en nuestra institución.

De los 41 sujetos astenoteratozoospermicos incluidos en la muestra se registró una edad promedio de 40,39 años \pm 0,79, Predominaron aquellos pacientes menores de 45 años.

En ambos grupos de estudio predominaron los pacientes con menos de 45 años y no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de edad según los grupos de estudio ($P > 0,05$)

A nivel muestral fueron más frecuentes aquellos pacientes con un tiempo de diagnóstico de Infertilidad menor a 10 años, siendo el tiempo predominante en ambos grupos de estudio. A nivel muestral fueron más frecuentes aquellos pacientes con presencia de comorbilidades, presentándose en similar proporción en ambos grupos de estudio. Siendo la comorbilidad más frecuente la Obesidad, la cual fue la más frecuente en ambos grupos. En segundo lugar, se presentó el Síndrome metabólico y en tercer lugar la HTA.

Un porcentaje muy bajo de pacientes refirieron antecedente de trastornos hormonales que alteraban la espermatogénesis, siendo las alteraciones más frecuentes: Hiperprolactinemia y Déficit de testosterona.

De los antecedentes urológicos presentados por los sujetos incluidos en la muestra se tiene que el más frecuente fue la prostatitis, seguido de los que se les había practicado cura de varicoele y en tercer lugar la epididimitis.

El grado de astenoteratozoospermia más frecuente fue la severa, siendo la más frecuente en ambos grupos de estudio.

En el grupo que se utilizó la separación con columnas de Anexina V el porcentaje de embarazos positivos levemente mayor que en el grupo donde se utilizó el método de selección convencional. Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de embarazos efectivos de ambos grupos ($P > 0,05$).

Las técnicas de Reproducción Asistida son algunos de los grande avances en la terapia de la infertilidad masculina, cuya técnica mejor aplicada es la Fertilización in Vitro con la Inyección Intracitoplasmatica del Espermatozoide, cuya obtención se realiza a través de métodos convencionales de selección espermática, sin embargo estos métodos no logran establecer la susceptibilidad del espermatozoide a fenómenos apoptóticos.

RECOMENDACIONES

Las muestras de pacientes infértiles deben ser consideradas en el contexto de la clínica de cada paciente, en cada caso es importante diagnosticar la patología espermática subyacente, incluyendo estudios ultraestructurales, fragmentación de ADN espermático, otros marcadores de apoptosis, trastornos andrológicos como varicocele, criptorquidia, infecciones, hormonales, etc. De esta manera precisar el diagnóstico y tomar medidas terapéuticas adecuadas.

Con mayor experiencia y un número elevado de muestras de manera prospectiva y ramdomizada, sería atrayente investigar el impacto de este método de selección espermática en las técnicas de reproducción asistida.

Se insta a los profesionales médicos urólogos, andrólogos, ginecólogos, biólogos, embriólogos, bioanalistas y a todo el equipo de salud especialista en medicina reproductiva a la ampliación del estudio del hombre infértil.

REFERENCIAS

- 1) Gianni Curti. Estudio del daño del ADN espermático en pacientes infértiles. [Tesina de grado]. Uruguay. Diciembre 2010. Disponible en: <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-14841.pdf>
- 2) Morales R1 , Lledó B1 , Ortiz José A1 , Rodríguez-Arnedo Dori1 , Fabregat A2 , Bernabeu R3,4. Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. Revista Iberoamericana de Fertilidad [Revista en la internet]. Vol. 24- nº 5 - Septiembre-Octubre 2007. Disponible en: https://www.institutobernabeu.com/ficheros/publicaciones/fragmentacion_adn_espermatico.pdf
- 3) Góngora-Rodríguez, M.D., Fontanilla-Ramírez. La fragmentación de ADN espermático, influencia sobre las técnicas de reproducción asistida y la calidad embrionaria. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 61 No. 2 • 2010 • (160-164). [Artículo de revisión]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v61n2/v61n2a09>
- 4) Martínez López. Obesidad e infertilidad en el varón. Asociación Española de Biopatología Médica. Noviembre 2011. Disponible en: <http://www.aebm.org/formacion%20distancia/distancia%202011-2012/Actualizaciones/monografias%202011/1.-%20OBESIDAD.pdf>
- 5) Rawe, Álvarez, Uriondo, Papier, Miasnik, Nodar. *Separación magnética por columnas de Anexina V: "filtrado molecular" para la selección de espermatozoides no apoptóticos*. Premios Figueroa Casas - Accesit Básico 2009 Revista Reproducción 2009; 24: 104-114. Disponible en: http://www.samer.org.ar/revista/numeros/2009/vol24_n3/4_separacion_magnetica.pdf
- 6) Barroso V., Colín V., Morales V., Osuna Z., Robledo T, Ávila L. *Efecto de la aplicación de columnas de Anexina V en los resultados reproductivos de parejas infértiles*. Ginecol Obstet Mex 2012;80(1):16-21. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2012/gom121d.pdf>
- 7) De Arriba R. "Apoptosis espermática en pacientes de TRA y columnas de Anexina." Trabajo Especial de Grado para optar al título de Master en Biología y tecnología de la Reproducción. Universidad de Oviedo. Centro Internacional de Postgrado. 2014. Disponible en: <http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/27722/6/Beatriz%20de%20Arriba.pdf>
- 8) Said T, Grunewald S, Paashch U y col (2005). Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques Reprod BioMed Online, 6:740-746.

- 9) Lopez N, Palacios S, Fernandez ML, Chinchilla N, Beunz M. N°3. El recurso a la reproducción asistida y selección de embriones. El problema intergeneracional. Cuadernos Bioetica. 2011.; 22(2): 325-340.
- 10) Gutierrez Maria. "Infertilidad humana. Tecnicas de Reproduccion Asistida" Tesis de Grado. Universidad de Sevilla. Grado en Farmacia. Departamento de Fisiologia. Sevilla, 2017. Disponible en: <https://idus.us.es/bitstream/handle>
- 11) Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Bauman T, Kriegel C, et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. Biol Reprod. 2006; 74 (3) 530-537.
- 12) Dirican Ek, Ozgun OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Ugurlu M 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 (8): 375-381.
- 13) Portella y Sepúlveda. "Evaluación del factor masculino en reproducción asistida: nuevas tecnologías." Rev Per Ginecol Obstet. 2011; 57: 21-27. Disponible: <http://www.redalyc.org/pdf/3234/323428199005.pdf>
- 14) Lobo García. *Relación entre la incorporación de las técnicas de selección espermática con columnas de anexina (MACS) en la muestra seminal y los resultados en los tratamientos de reproducción asistida.* Tesis Doctoral. Universidad Autónoma De Madrid Facultad De Medicina Departamento De Obstetricia Y Ginecología. Madrid, 2017. Disponible en: https://repositorio.uam.es/xmlui/bitstream/handle/10486/680036/lobo_garcia_silvia.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- 15) Hernández, Fernández y Baptista. Metodología de la Investigación. Cuarta edición. Mac Graw Hill editores. México D.F. México. 2006:103,104, 205
- 16) Londoño J. Metodología de la Investigación epidemiológica. 3ª edición. Editorial Manual moderno S. A. Bogotá. Colombia. 2004:7
- 17) Arias F. El Proyecto de Investigación. (6a. ed.). Editorial Episteme. Caracas. Venezuela. 2010: 48, 54

- 18) López Puertas E, Urbina J, Blanck, E, Granadillo D, Blanchard M, García J, Vargas P, Chiquito A. Bioestadística – Herramienta de la investigación. CDCH – UC. Valencia. Venezuela. 1998; 1: p 13, 45,46

- 19) Tapia Serrano, Rosario. Una visión actual de la infertilidad masculina. Revista Mexicana de Reproducción, 2012; 4(3) 103-109. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/reproduccion/mr-2012/mr123b.pdf>

- 20) Ballester Martha, Boada Montse, Mateo Silvia, Buxaderas Rosario, Vendrell Josep, Coroleu Buenaventura, Veiga Anna. Revista de Medicina Reproductiva y Embriología Clínica de la Reproducción, Vol 3. Num 3. Pag: 113-168. Diciembre 2016. Barcelona, España. Disponible en: [www.elsevier.es>es-revista-medicina-reproductiva-embriologia-clinica-390-mas-leidos](http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-reproductiva-embriologia-clinica-390-mas-leidos).

ANEXO A

FICHA DE REGISTRO

HISTORIA		FECHA	
Edad (años)	21 – 30	Años de infertilidad	< 5 años
	31 – 40		≥5 años
	41 – 50		
Comorbilidades	Presente Tipo	Antecedente del uso de técnicas de reproducción asistida	Si Tipo Veces
	Ausente		No
Antecedentes Urológicos	Presente Tipo	Trastornos asociados a la espermatogénesis	Presente tipo
	Ausente		Ausente
Grado de astenoteratozoospermia	Leve	Embarazo	Si
	Moderado		
	Severo		No
