



Comparación de la técnica de gradientes vs técnica de microfluidos para separación espermática

Comparison of gradient technique vs microfluidic technique for sperm separation.

Esperanza Carballo-Mondragón, Leonor Durán-Monterrosas, Elizabeth Cervantes-Ibarra, Alberto Kably-Ambe

Resumen

OBJETIVO: Comparar la técnica de microfluidos con la de separación de gradientes y evaluar la recuperación espermática en sus parámetros de movilidad, concentración e índice de fragmentación.

MATERIAL Y MÉTODO: Estudio prospectivo, longitudinal, en el que de junio de 2017 a junio de 2018 se estudiaron pacientes aptas para procedimientos de FIV. La muestra de cada paciente se dividió en dos porciones (de acuerdo con las características de cada procedimiento): grupo I, técnica de gradientes y grupo II, técnica de microfluidos. Se evaluaron las características de movilidad, morfología e índice de fragmentación.

RESULTADOS: Se incluyeron 22 pacientes. Con la técnica de microfluidos se encontró mayor movilidad (grupo I: 84.6% vs grupo II: 94.3%, $p < 0.012$) y menor índice de fragmentación que con la técnica de gradientes (25.7 vs 8.6%; $p < 0.001$).

CONCLUSIÓN: La técnica de microfluidos es una buena opción para la preparación de muestras seminales, porque evita el paso de la centrifugación y mejora los parámetros finales de la muestra, además de ser un procedimiento más fácil y rápido.

PALABRAS CLAVE: Microfluidos; fragmentación de ADN.

Abstract

OBJECTIVE: To compare the technique of microfluidics with the separation of gradients and to evaluate sperm recovery in their parameters of mobility, concentration and DNA fragmentation index (DFI).

MATERIAL AND METHOD: A longitudinal prospective study was done from June 2017 to June 2018 in patients who underwent IVF procedures. The sample of each patient was divided into two portions (according to the characteristics of each procedure): Group I, the gradient technique was performed; Group II, the microfluidic technique (MF) was performed. The characteristics of mobility, morphology and DFI were evaluated.

RESULTS: With the MF technique, greater mobility was found (group I: 84.6% vs group II: 94.3%, $p < 0.012$) and lower DFI than with the gradient technique (25.7 vs 8.6%, $p < 0.001$).

CONCLUSION: The MF technique is a good option for the preparation of seminal samples, since it avoids the passage of centrifugation and improves the final parameters of the sample, besides being an easier and faster procedure.

KEYWORDS: Microfluidics; DNA fragmentation.

Centro Mexicano de Fertilidad.

Recibido: enero 2019

Aceptado: abril 2019

Correspondencia

Alberto Kably Ambe
perita_1@yahoo.com

Este artículo debe citarse como

Carballo-Mondragón E, Durán-Monterrosas L, Cervantes-Ibarra E, Kably-Ambe A. Comparación de la técnica de gradientes vs técnica de microfluidos para separación espermática. Reproducción (México) 2019; Vol. 10: 7 de mayo 1-6
<https://doi.org/10.24245/rmmr.v10id.3108>

ANTECEDENTES

El factor masculino sobreviene en, incluso, 50% de las parejas con problemas de fertilidad. Durante su evaluación se ha detectado que el daño a la cromatina del espermatozoide representa una causa destacable que pueda explicar la falta de fertilidad en estos pacientes.

Aunque una de las herramientas más importantes en la evaluación espermática corresponde al análisis seminal convencional, la estandarización de las técnicas para cuantificar el índice de fragmentación ha significado un avance importante en la detección de anomalías porque se ha observado, por ejemplo, que en pacientes normozoospermicos puede haber incremento del índice de fragmentación del ADN espermático, lo que a la larga pudiese explicar la infertilidad de parejas en donde todo parece normal.

Existen numerosos estudios que demuestran la importancia de la estabilidad de la cromatina y su correlación con los resultados reproductivos en animales y en humanos, la alteración de esta estabilidad afecta la capacidad funcional del espermatozoide. El daño a la cromatina puede suceder en diferentes etapas de la espermatogénesis, pero un paso fundamental es durante la protaminación, porque si hay un error en esta fase se incrementa la susceptibilidad a daño por agentes externos, como serían los radicales libres de oxígeno (ROS) que causan aumento en la fragmentación del ADN espermático.¹⁻⁴

En la actualidad diversos estudios demuestran la importancia de la estabilidad del núcleo del espermatozoide y su correlación con los resultados en técnicas de reproducción asistida de baja y de alta complejidad. Los principales efectos del índice de fragmentación se reflejan en alteración del desarrollo embrionario, menor tasa de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto,

menores tasas de implantación, aumento en abortos y algo muy importante es que puede trascender en la salud del futuro individuo.^{1,5-7}

Hasta hace poco tiempo existía gran controversia en cuanto al punto de corte de la fragmentación, debido a las diferentes técnicas que existen para su medición, pero actualmente en la mayor parte de las publicaciones se menciona que con un índice mayor a 30% es nula o muy baja la tasa de embarazo, ya sea en FIV o para inseminación intrauterina.^{2,3,8-10}

El ovocito tiene la capacidad de reparación de algunas alteraciones del espermatozoide, pero esto depende del grado de daño y la calidad del ovocito, por ejemplo, cuando hay daño en doble cadena las posibilidades de reparación son menores.¹¹⁻¹⁴

Con el uso de ICSI se pensó que podría resolverse el problema del factor masculino, pero se ha demostrado que si hay aumento del índice de fragmentación se incrementan las tasas de aborto y disminuye la implantación.^{1,15-17}

Para cualquier procedimiento de ART es necesario procesar las muestras seminales por medio de técnicas de separación, que tratan de imitar la selección natural del espermatozoide en su paso por el aparato reproductor femenino, donde llega aproximadamente 0.1% de los espermias del eyaculado a las trompas de Falopio. El objetivo de estas técnicas es eliminar los restos celulares, plasma seminal, espermatozoides inmóviles y aquellos con menos alteraciones morfológicas, además de seleccionar los que tengan menor índice de fragmentación.^{3,9,12,16,18}

Las principales técnicas de separación son el *swim-up* y la separación con gradientes, ambas son eficientes y han mostrado buena efectividad para seleccionar espermatozoides con menor índice de fragmentación.^{9,19-21}



La separación con los dispositivos con microfluidos, es una de las nuevas técnicas que permite eliminar el paso de la centrifugación. Está fundamentada en el comportamiento de microambiente basado en la dinámica de fluidos en un sistema de canales donde debido a la reducción o eliminación de la turbulencia (esto según las características de los canales) el movimiento es por difusión.^{10,15,16,18}

Esta técnica tiene relativamente poco tiempo realizándose y debido a que se han desarrollado diferentes dispositivos, aún no hay resultados estandarizados, pero en general todos han probado tener resultados prometedores, al seleccionar espermatozoides con menor índice de fragmentación.^{10,15,18}

Por lo anterior el objetivo de este estudio fue comparar la técnica de microfluidos con la técnica de separación de gradientes y evaluar la recuperación espermática en sus parámetros de movilidad, concentración y índice de fragmentación.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo, longitudinal, en el que se estudiaron pacientes que entraron a procedimientos de FIV. La muestra de cada paciente se dividió en dos porciones (de acuerdo con las características de cada procedimiento): al grupo I se le realizó la técnica de gradientes y en el grupo II se llevó a cabo la técnica de microfluidos.

Para el grupo I (gradiente), la separación se efectuó con el medio Isolate (Irvine Sci). El procedimiento se realiza con dos interfases: una mayor y una de menor densidad (40 y 80%, respectivamente) y sobre estas fases se coloca la muestra seminal; para su separación se realiza centrifugación y al botón obtenido en la interfase de mayor densidad se le realiza un lavado con medio, a través de otra centrifugación.

Para el grupo II (microfluidos) se utilizó el dispositivo Fertile Plus (*microfluidic sperm sorting chip*, Koek Biotechnology); éste tiene una entrada para colocar la muestra (sólo se pueden depositar 0.85 mL de muestra por dispositivo) y está cubierto por una membrana, sobre la que se coloca el medio. Después de 30 minutos de incubación se toman 0.5 mL de la muestra por la salida.

Para el análisis inicial de la muestra se cuantificó: el volumen, concentración, movilidad y morfología (**Cuadro 1**). A la evaluación final se realizó la medición del índice de fragmentación del ADN, con la técnica de dispersión de la cromatina (Halosperm Kit, HT-HS10).

Los resultados se analizaron con el programa JMP 9.0, mostrando los resultados con prueba t de Student.

RESULTADOS

Se incluyeron 22 pacientes. Las características de las muestras iniciales se muestran en el **Cuadro 1**.

En el **Cuadro 2** se muestran los resultados finales de cada parámetro medido.

Cuadro 1. Características generales y parámetros de la muestra inicial (n = 22)

Parámetro	Valores iniciales
Edad de la paciente (años)	34.91 ± 5.45
Edad del varón (años)	38.86 ± 6.58
Volumen inicial (mL)	2.34
Densidad (mil/mL)	65.82
Movilidad progresiva (%)	50.36
Movilidad total (%)	61.86
Morfología normal (%)	4.59

Cuadro 2. Resultados finales por grupo de estudio

Parámetro	Grupo I (gradiente), media (intervalo)	Grupo II (microfluidos), media (intervalo)	p
Volumen final (mL)	0.31 (0.1-0.5)	0.45 (0.3-0.5)	0.001
Densidad final (millones/mL)	52.59 (5-112)	26.95 (1-94)	0.0001
Movilidad total (%)	84.68 (31-100)	94.35 (82-100)	0.012
Morfología normal (%)	2.67 (2-3)	3.0 (2-4)	0.643
Índice de recuperación (%)	61.24	66.55	0.78
Índice de fragmentación (%)	25.73 (0-73)	8.64 (0-40)	0.001

En el volumen y la densidad, se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

La movilidad tuvo diferencia significativa entre grupos, fue mayor en el grupo II (grupo I: 84.6% vs grupo II: 94.3%, $p < 0.012$). En cuanto a la morfología no mostró diferencia significativa entre grupos.

El índice de recuperación de células móviles fue mayor en el grupo II, si bien no tuvo diferencia significativa.

En el índice de fragmentación se observó diferencia significativa entre grupos (25.7% en el grupo I (gradiente) vs 8.6% en el grupo II (microfluidos); $p < 0.001$).

DISCUSIÓN

Cuando se desarrollaron las primeras técnicas de separación espermática se enfocaban más en la recuperación de las células móviles. Las más usadas son el *swim-up* y la separación por gradientes de densidad, éstas han resultado eficientes mejorando la recuperación de células móviles y mejor selección en cuanto a la morfología y mejor recuperación de espermatozoides con menor grado de fragmentación del ADN. Sin embargo, ya que uno de los pasos del proceso de ambas es la centrifugación, a pesar de mejorar la selección, también pueden aumentar la generación de radicales libres de oxígeno (ROS).^{2,9}

En este estudio se encontró diferencia en la recuperación final de la muestra en cuanto al volumen y la densidad final, pero esto se debe a que con gradientes (grupo I), puede usarse mayor volumen y, por tanto, mayor número de células para su preparación, en cambio, con microfluidos (grupo II), sólo puede usarse un volumen específico bajo para procesarla, pero al comparar el porcentaje de recuperación de células móviles, no se encontró diferencia significativa entre los grupos I y II (61.2 vs 66.5%).

En cuanto a la movilidad se observó mayor recuperación con el uso de microfluidos, lo que concuerda con otros reportes. La mayor parte de los estudios realizados que comparan las técnicas de separación con microfluidos, se han realizado con la técnica *swim-up*, hay pocos que comparan con gradientes.^{2,12,16}

Los dispositivos para separación espermática con microfluidos son relativamente nuevos, y existen diferentes modelos en el mercado, por lo que su estandarización y comparación de resultados puede ser complicada; sin embargo, la mayor parte de los reportes coinciden en reducción del índice de fragmentación.^{10,16,19,22}

Encontramos diferencia significativa en cuanto a la recuperación de espermatozoides con menor índice de fragmentación, al igual que Schuster y



colaboradores (2003), quienes también compararon con gradientes de densidad.^{3,9,19}

Debido a que el aumento en el índice de fragmentación causa alteraciones importantes en los resultados de ART, incluso si se realiza la técnica de ICSI para seleccionar mejor al espermatozoide, sobre todo en ciclos de pacientes con fallas de implantación, altas tasas de aborto o ambas, puede decirse que la técnica de microfluidos también es buena opción de preparación y, aunque tiene menor recuperación en cuanto a cantidad, puede usarse para pacientes con oligozoospermia, en quienes sólo se efectuará ICSI y no se requiere gran cantidad de espermatozoides. Aún utilizando la técnica de ICSI, donde aparentemente realizamos mejor selección espermática, puede haber mayor riesgo de aborto si existe aumento en el índice de fragmentación, por lo que al realizar una mejor técnica de separación y apoyarse con la micromanipulación para la selección se incrementan las posibilidades de éxito.^{11,17,22-24}

CONCLUSIONES

La técnica de microfluidos para la separación espermática de muestras seminales demuestra ser una buena opción porque evita el paso de la centrifugación y mejora la tasa de recuperación de movilidad espermática con menor índice de fragmentación.

REFERENCIAS

1. Absalan F, Ghannadi A, Kazerooni M, Parifar R, Jamalzadeh F, Amiri S. Value of sperm chromatin dispersion test in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:11-14.
2. Cicaréa J, Avila A, Caille A, Munuce MJ. Incorporación del test de dispersión de la cromatina espermática al laboratorio andrológico. *Rev Int Androl* 2016;14(4):137-143.
3. Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art—physiological aspects and application of Advanced sperm preparation methods. *Asian J Andrology* 2012;14:260-269.
4. Miyuki TP, Ferreira LN, de Assis GM, de Paula FC, Paulo IJ, Monte GCA. Assessment of Sperm DNA in patients submitted the assisted Reproduction technology procedures. *JBRA Assisted Reproduction* 2016;20(1):17-22.
5. Alvarez SC, Bilinski M, Lorenzi D, Uriondo H, Noblía F, Longobucco V, Ventimiglia LE, Nodar F. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects. *JBRA Assisted Reproduction* 2017;21(4):343-350.
6. Pacheco CA. Evidencias de la participación del varón en los fallos de implantación y abortos tras TRA. XXIX Congreso nacional SEF. Granada 2012; 29 suplemento 1.
7. Tamburrino L, Marchiani S, Montoya M, Elia MM, Natali I, Cambi M, Forti, Baldi E, Muratori M. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl* 2012;14:24-31.
8. Bradley CK, McArthur SJ, Gee AJ, Weiss KA, Schmidt U, Toogood L. Intervention improves assisted conception intracytoplasmic sperm injection outcomes for patients with high levels of sperm DNA fragmentation: a retrospective Analysis. *Andrology* 2016;4:903-910.
9. Malvezzi H, Sharma R, Agarwal A, Abuzenadah AM, Abu-Elmagd M. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. *Reproductive Biol Endocrinol* 2014;12:121.
10. Shirota K, Yotsumoto F, Itoh H, Obama H, Hidaka N, Nakajima K, Miyamoto S. Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertil Steril* 2016;105:315-21.
11. Gonsálvez J, López-Fernández C. La fragmentación del ADN espermático vista a 10x o a 100x aumentos. XXIX Congreso nacional SEF. Granada 2012; 29 suplemento 1.
12. Kishi K, Ogata H, Ogata S, Mizusawa Y, Okamoto E, Matsumoto Y, Koikeguchi S, Shiotani M. Frequency of sperm DNA fragmentation according to selection method: Comparison and relevance of a microfluidic device and a swim-up procedure frequency of sperm DNA fragmentation according to selection method: Comparison and relevance of a microfluidic device and a swim-up procedure. *J Clin Diagnostic Res* 2015;9(11):QC14-QC16.
13. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, Kirkman-Brown J, Coomarasamy A. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2012;27(10):2908-2917.
14. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93:1027-36.
15. Matsuura K, Uozumi T, Furuichi T, Sugimoto I, Kodama M, Funahashi H. A microfluidic device to reduce treatment time of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2013;99:400-7.
16. Sakkas D. Novel technologies for selecting the best sperm for *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2013;99:1023-9.
17. Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, Joshi R, Delhanty JDA, Serhal P. Fall in implantation rates following ICSI with

- sperm with high DNA fragmentation. Hum Reprod 2010;25(7):1609-1618.
18. Suh RS, Phadke N, Ohl DA, Takayama S, Smith GD. Rethinking gamete/embryo isolation and culture with microfluidics. Hum Reprod Update 2003;9(5):451-461.
19. Schuster TG, Cho B, Keller LM, Takayama S, Smith GD. Isolation of motile spermatozoa from semen samples using microfluidics. RBMOnline 2003;7(1):75-81.
20. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. Hum Reprod 2010;25(7):1594-1608.
21. Tasoglua S, Safaeea H, Zhanga X, Kingsleye JL, Catalanoa PN, Gurkana UA, Nureddina A, Kayaalpb E, Anchanc RM, Maasd RL, Tüzele E, Demirci U. Exhaustion of Racing Sperm in Nature-Mimicking Microfluidic Channels During Sorting. Small 2013;25:9.
22. Góngora RA, Fontanilla RD. La fragmentación de ADN espermático influencia sobre las técnicas de reproducción asistida y la calidad embrionaria. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología 2010;61(2):160-164.
23. Liu D, Liu M. Clinical value of sperm DNA damage should be assessed in motile sperm fraction rather than whole ejaculated sperm. Fertil Steril 2013;99:367-71.
24. Oleszczuk K, Augustinsson L, Bayat N, Giwercman A, Bungum M. Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile Couples. Andrology 2013;1:357-360.