

Comparación de los medios hialuronato (SpermSlow) y polivinilpirrolidona en la selección espermática para inyección intracitoplasmática de espermatozoides

Arturo Brassesco-Macazzaga, Felipe del Río-Bueno, Olga Cairo-Doncos, Sergio Rovira-Fontanals, Ana Monqaut y Mario Brassesco-Macazzaga

Laboratorio de fertilización in Vitro. Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH). Clínica Corachán. Barcelona. España.

RESUMEN

Objetivo: El estudio del espermatozoide, desde el punto de vista morfológico y funcional, constituye un aspecto de gran importancia para la evolución de las técnicas de reproducción asistida. Diversos trabajos han revelado que el ácido hialurónico, presente en la matriz extracelular del ovocito, contribuye a la fertilidad del espermatozoide a través de receptores ubicados en la membrana de éste^{1,2}.

En el presente trabajo se evalúan las tasas de fecundación y calidad embrionaria en día +2 y día +3 obtenidos mediante la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) utilizando espermatozoides seleccionados según su capacidad de reaccionar al ácido hialurónico.

Material y métodos: Se realizó un estudio prospectivo comparativo entre los medios de hialuronato (SpermSlow, Medicult) y el polivinilpirrolidona (PVP, Medicult) en la selección espermática de pacientes sometidas a ICSI.

Resultados y discusión: Se fertilizaron 517 ovocitos, 252 con espermatozoides seleccionados en PVP y 265 seleccionados en SpermSlow por su capacidad de reaccionar al hialuronato. Las tasas de fertilización normal fueron similares en ambos grupos. Sin embargo, la comparación de las calidades embrionarias según los criterios de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), España, reveló diferencias a nivel de embriones tipo A y tipo D. En el medio con hialuronato se obtuvo un mayor porcentaje de embriones tipo A que con PVP, esta diferencia fue estadísticamente significativa en el día +2. En cuanto a los embriones tipo D, se encontraron menor cantidad de embriones de esta calidad en el medio SpermSlow.

Conclusiones: Las diferencias encontradas y el hecho de que el hialuronato constituye un medio natural que presumiblemente no posee efectos tóxicos para el ovocito, hacen que este medio constituya una mejor elección a la hora de realizar la selección espermática.

Palabras clave: Hialuronato. PVP. ICSI. Selección espermática.

Correspondencia: Dr. A. Brassesco-Macazzaga.
Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH).
Clínica Corachán. Plaza Eguilaz, 14. 08017 Barcelona. España.
Correo electrónico: laboratorio@cirh.es

ABSTRACT

Comparison between hyaluronan (SpermSlow) and polyvinylpyrrolidone media in sperm selection for intracytoplasmic sperm injection

Objectives: Morphological and functional sperm cell studies are a very important aspect in the evolution of assisted reproduction techniques. Previous works have shown that the hyaluronic acid present in the extra-cellular matrix of the oocyte contributes to its fertility through receptors present in the sperm head membrane^{1,2}.

In the present work the fertilization rates and embryo quality on day +2 and day +3 obtained from oocytes microinjected with sperm that had been previously selected by their capacity to bind hyaluronic acid were evaluated.

Material and methods: A prospective study was performed comparing hyaluronan (SpermSlow) and PVP (polyvinylpyrrolidone, Medicult) media for sperm selection in ICSI patients.

Results and discussion: A total of 517 oocytes were fertilized; 252 with sperm in PVP and 265 in SpermSlow, and selected by their capability to bind to hyaluronan. The fertilization rates were similar in both groups. However, comparison between embryo qualities following ASEBIR criteria showed differences in type A and type D group frequencies. A higher frequency of type A embryos was observed with hyaluronan medium than with PVP, with a statistically significant difference in day +2. Furthermore, a lower frequency of embryos type D was found in the SpermSlow group.

Conclusions: This differences and the fact that hyaluronan is a natural medium with presumably no toxic effects for the oocyte, indicate that hyaluronan may be a better choice for sperm selection.

Key words: Hyaluronate. Hyaluronic acid. PVP. ICSI. Sperm selection.

INTRODUCCIÓN

Desde su aparición en 1972, las técnicas de reproducción asistida han mostrado una rápida evolución. En sus comienzos, las técnicas existentes, no eran eficientes para solucionar el problema de fertilidad de parejas que presentaban esterilidad por factor masculino debido a daño espermático. Una solución a este problema surgió en 1992 con el desarrollo de la técnica de microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Sin embargo, y a pesar de los buenos resultados obtenidos con la implementación de esta técnica, aún hay factores que influyen en el desarrollo embrionario en estos pacientes que permanecen enigmáticos.

En la actualidad, las técnicas de reproducción asistida se basan en la utilización de métodos fiables de selección espermática previa a la realización de la ICSI. Dicha selección, basada en características morfológicas y funcionales del espermatozoide, permite lograr mejores tasas de fecundación, desarrollo embrionario y embarazos, así como también la disminución de las tasas de aborto³⁻⁸.

Estudios de las características morfológicas del espermatozoide han revelado que la presencia de anomalías acrosómicas y subacrosómicas se encuentran asociadas a fallos de fecundación *in vitro* mediante ICSI. Más recientemente, la observación de la morfología espermática a gran aumento ha revelado que la presencia de vacuolas nucleares estaría también relacionada con una función espermática deficiente⁹. En la actualidad, se ha implementado el uso de alta magnificación en la selección espermática (*intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*) previa al ICSI con el objetivo de realizar una selección morfológica más exhaustiva en los pacientes que presentan un claro factor masculino y/o abortos previos¹⁰⁻¹³.

En cuanto a la funcionalidad del espermatozoide, diversos estudios han revelado que el ácido hialurónico, un mucopolisacárido no sulfatado presente en la matriz extracelular del ovocito, es uno de los componentes que más contribuye a la fertilidad a través de la interacción con receptores específicos presentes en la membrana del espermatozoide maduro^{1,14}. Por lo tanto, la evaluación de la capacidad del espermatozoide de unirse al ácido hialurónico constituye una forma de valorar su madurez y funcionalidad¹⁵⁻¹⁷.

Por tal motivo, en este trabajo se propuso evaluar los beneficios de realizar la selección espermática basándose en las características funcionales del espermatozoide, utilizando como método de selección la capacidad del espermatozoide de reaccionar al hialuronato presente en el medio SpermSlow (Medicult).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo comparativo entre los medios de Hialuronato (SpermSlow, Medicult) y polivinilpirrolidona (PVP, Medicult) en la selección espermática de pacientes sometidos a ICSI. En el estudio se incluyeron 60 pacientes, de los cuales se recuperaron entre 8 y 16 ovocitos con un porcentaje de más de 60% de ovocitos a microinyectar (MII). Los ovocitos de cada paciente fueron clasificados según su morfología y divididos en 2 grupos de calidad similar. Un grupo se fertilizó mediante técnica de ICSI con espermatozoides seleccionados por medio de hialuronato y el otro por PVP. En todos los pacientes se evaluaron tasas de fertilización y desarrollo embrionario en días +2 y +3 para su posterior transferencia embrionaria.

Criterios de inclusión

– Mujeres menores de 35 años en las cuales se recuperaron entre 8 y 16 ovocitos con un porcentaje de más del 60 % de ovocitos MII.

– Varones con oligoastenozoospermia moderada o severa y menores de 45 años.

Técnica

– Placas de PVP: en una placa de Petri de 55 mm se colocaron 2 gotas de 5 μ l de PVP a las cuales se agregó 1 μ l de espermatozoides previamente capacitados. Alrededor de éstas se colocaron 8 microgotas de 5 μ l de ICSI Holding Medium (Medicult) donde se incorporaron los ovocitos MII. Se cubrió con aceite de parafina y posteriormente se procedió a la microinyección convencional.

– Placas de SpermSlow: en otra placa de Petri se procedió de la misma forma que la anterior, sustituyendo el PVP por medio SpermSlow, pero en lugar de agregar al medio 1 μ l de espermatozoides capacitados, se depositó la gota capacitada inmediatamente al lado de una de las gotas de SpermSlow, juntando muy cuidadosamente ambas gotas (fig. 1). Se incubó 15 min al 5% de CO_2 a 37 °C. Posteriormente, se procedió a seleccionar los espermatozoides móviles que quedaron adheridos en la interfase de las gotas para realizar, seguidamente, la microinyección (fig. 2).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS. La comparación de las calidades embrionarias en días +2 y +3 se realizó mediante el test de la χ^2 .

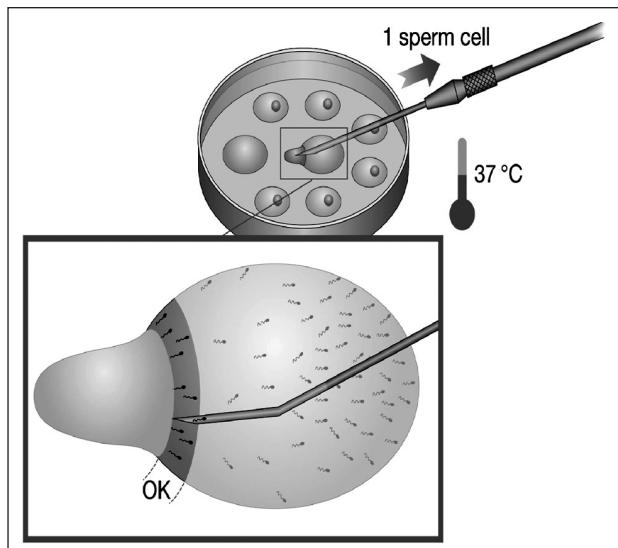


Figura 1. Diagrama que muestra cómo se realiza la selección espermática con SpermSlow. Tomada de How to select the best mature spermatozoa for ICSI, con autorización de MediCult.

RESULTADOS

Se fertilizaron 517 ovocitos, 252 por PVP y 265 por SpermSlow, de los cuales en el grupo de PVP fertilizó de forma normal el 83,3%, anormal el 2% y no fertilizó el 14,7% de los ovocitos, mientras que en el grupo del SpermSlow fertilizó de forma normal el 84,9%, anormal el 1,9% y no fertilizó el 13,2% (fig. 3). La calidad embrionaria se analizó según criterios de ASEBIR del año 2008 en A-B-C-D.

En el día + 2 se observó, con PVP, un 9,3% de embriones tipo A, un 30,2% tipo B, un 43,3% tipo C, un 12,6% tipo D y un 4,6% de embriones no evolutivos

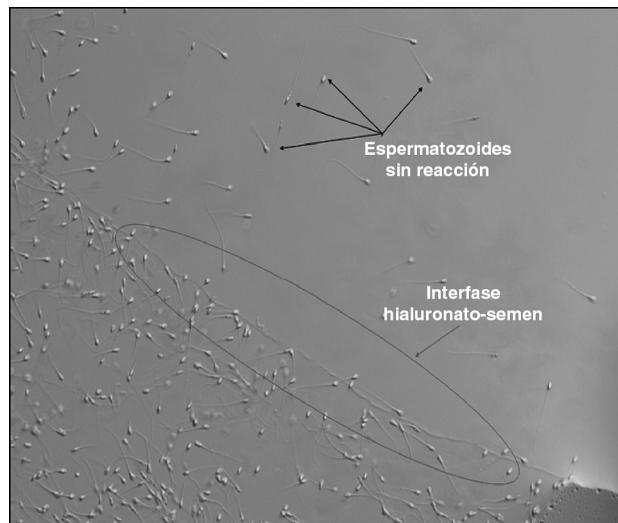


Figura 2. Espermatozoides en la interfase hialuronato-semen (aumento, $\times 400$).

(fig. 4). Con SpermSlow, se observó un 23,1% tipo A, un 26,1% tipo B, un 36,1% tipo C, un 3% tipo D y un 11,7% de embriones no evolutivos (fig. 4). En cuanto al día +3 se observó en el grupo de PVP un 15,1% de embriones de calidad embrionaria de tipo A, un 30,2% tipo B, un 33,2% tipo C, un 12,2% tipo D y un 9,3% no evolutivos, y con SpermSlow un 20,8% tipo A, un 26,6% tipo B, un 36,4% tipo C, un 12,3% tipo D y un 3,9% no evolutivos (fig. 5).

El análisis estadístico mediante el test de la χ^2 de las calidades embrionarias en día +2 reveló que hay diferencias con un nivel de significación de 0,022 (significativo $< 0,05$) para las calidades A y D, siendo la calidad A mayor en SpermSlow y la D mayor en PVP.

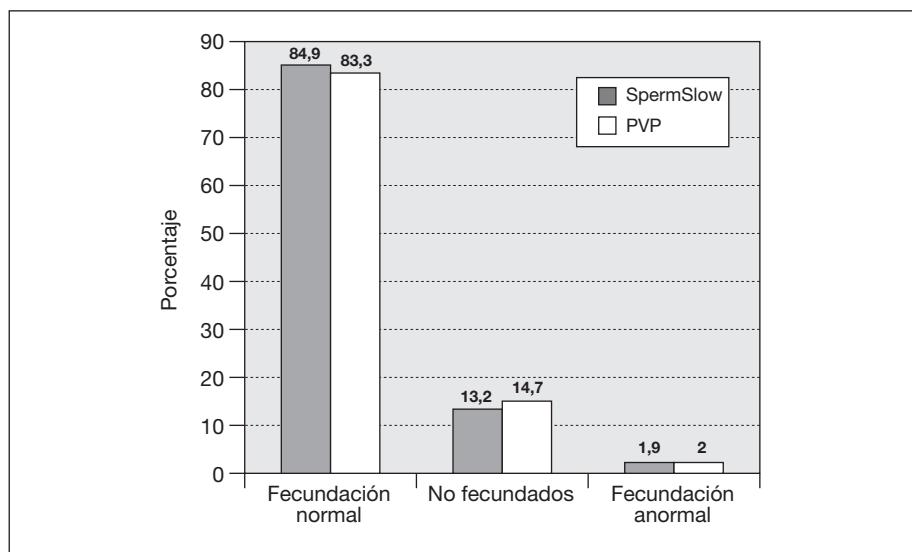


Figura 3. Tasa de fecundación de ovocitos microinyectados con espermatozoides seleccionados en SpermSlow o PVP.

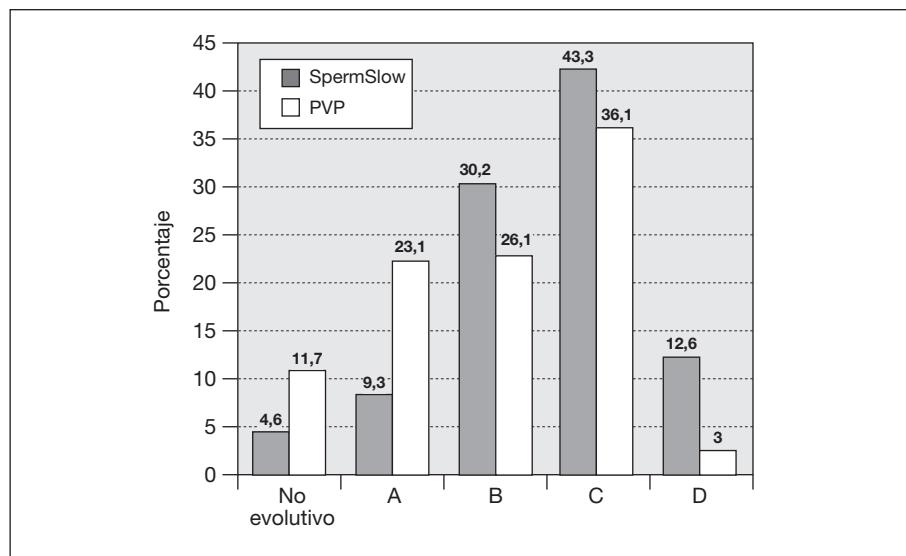


Figura 4. Calidades embrionarias a día +2 de ovocitos microinyectados con espermatozoides seleccionados en SpermSlow o polivinilpirrolidona (PVP).

En cuanto al día +3, las diferencias encontradas no resultaron significativas según dicho test (nivel de significación: 0,914).

DISCUSIÓN

La selección de espermatozoides para la microinyección contribuye en forma importante al éxito de la ICSI. Previamente, se ha demostrado que los espermatozoides capaces de unirse al hialuronato son más maduros, contienen menor daño en el ADN y menor número de aneuploidías^{18,19}. Esta observación ha llevado a la conclusión que el hialuronato constituiría un buen medio de selección de espermatozoides madu-

ros, y en la actualidad esta hipótesis se encuentra bajo estudio intensivo en diversos laboratorios²⁰⁻²⁴.

En el presente trabajo se compararon las tasas de fecundación y calidades embrionarias en días +2 y +3 obtenidas de ovocitos MII por ICSI con espermatozoides seleccionados en medios de PVP y SpermSlow que contienen hialuronato. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a las tasas de fecundación obtenidas en los 2 tratamientos (fig. 3). Sin embargo, la comparación de las calidades embrionarias según los criterios de ASEBIR, reveló diferencias de embriones tipo A y tipo D. En el medio con hialuronato se obtuvo un mayor porcentaje de embriones tipo A que en PVP, esta diferencia fue más importante en el día +2 que en el día +3. En

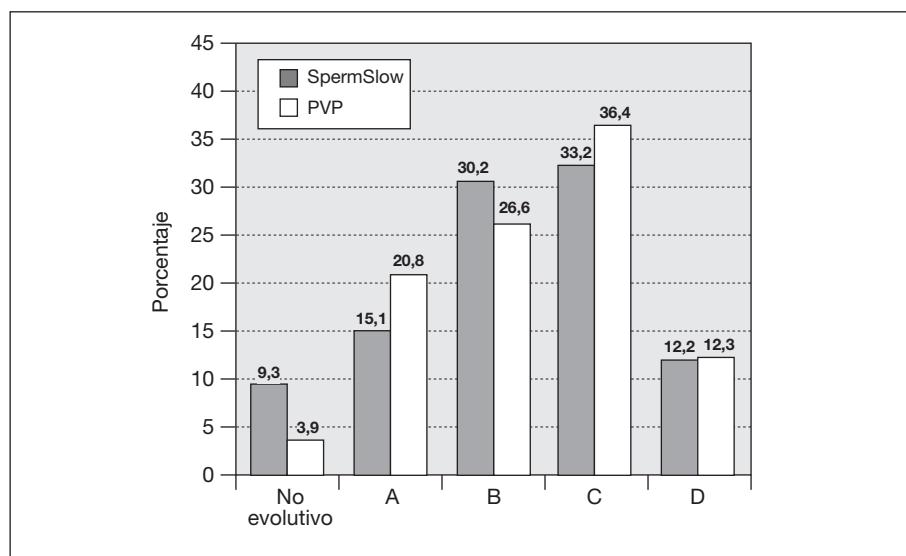


Figura 5. Calidades embrionarias a día +3 de ovocitos microinyectados con espermatozoides seleccionados en SpermSlow o polivinilpirrolidona (PVP).

cuanto a los embriones tipo D, se encontraron menor cantidad de embriones de esta calidad en el medio SpermSlow (figs. 4 y 5).

Si bien las diferencias encontradas resultaron ser estadísticamente significativas sólo en día +2, no se puede desestimar la tendencia observada también en día +3.

Las diferencias obtenidas en las calidades embrionarias, revelan que el uso de hialuronato en el medio de selección-inyección de espermatozoides favorecería la selección de espermatozoides de mejor calidad. Adicionalmente, otra ventaja del hialuronato es que se trata de un compuesto naturalmente presente en el ovocito y, por lo tanto, que no posee efectos dañinos; en cambio, el PVP es un compuesto no metabolizable que podría presentar efectos adversos^{15, 25}.

CONCLUSIÓN

El presente trabajo revela que el método de selección espermática basado en la funcionalidad del espermatozoide a través de su capacidad de reacción al hialuronato es un método que aporta los mismos resultados que el PVP en cuanto a tasas de fecundación y, además, posee una tendencia a mostrar mejores calidades embrionarias. Adicionalmente, el SpermSlow posee la ventaja de ser un medio similar al natural y, de esta manera, evitaría el uso de sustancias que pueden tener efectos dañinos. En un futuro, sería necesario complementar el presente estudio con resultados de tasas de embarazo y de aborto, en donde podrían encontrarse mayores evidencias de las ventajas del método funcional de selección espermática.

Bibliografía

1. Ghosh I, Chattopadhyaya R, Kumar V, Chakravarty BN, Datta K. Hyaluronan binding protein-1: a modulator of sperm-ooctye interaction. *Soc Reprod Fertil.* 2007;63 Suppl:539-43.
2. Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Soc Reprod Fertil.* 2007;65 Suppl: 515-25.
3. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992;340:17-8.
4. Ng FL, Liu DY, Baker HW. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum Reprod.* 1992;7:261-6.
5. Fishel S, Jackson P, Antinori S, Johnson J, Grossi S, Versaci C. Subzonal insemination for the alleviation of infertility. *Fertil Steril.* 1990;54:828-35.
6. Antinori S, Panci C, Caffa B, Selman HA, Dani G, De Pavova A, et al. The RAPRUI Center experience: from SUZI, through lasers to ICSI using spermatozoa with broken tails. *Hum Reprod.* 1995;10:489-91.
7. Kahraman S, Akarsu C, Cengiz G, Dirican K, Sozen E, Can B, et al. Fertility of ejaculated and testicular megalohed spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1999;14:726-30.
8. De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2003;79:42-8.
9. Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, et al. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online.* 2006;12:634-8.
10. Bartoo B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl.* 2002;23:1-8.
11. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, et al. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod.* 2005;20:185-90.
12. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, D'Angelo D, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online.* 2008;16:835-41.
13. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, et al. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of vacuoles. *Reprod Biomed Online.* 2008;17:617-27.
14. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril.* 2003;79:1616-24.
15. Barak Y, Menezo Y, Veiga A, Elder K. A physiological replacement for polyvinylpyrrolidone (PVP) in ART. *Fertil Steril.* 2001;76 Suppl 1:S17.
16. Barak Y, Menezo Y, Veiga A, Elder K. A physiological replacement for polyvinylpyrrolidone (PVP) in assisted reproductive technology. *Hum Fertil.* 2001;4:99-103.
17. Bacer Kermavner L, Virant-Klun I, Vrtacnik-Bokal E, Tomazevic T. Sperm selection with hyaluronan for ICSI procedures and blastocyst development. *Hum Reprod.* 2008;23 Suppl 1:i157-9.
18. Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, et al. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2003;7:462-8.
19. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril.* 2005;84:1665-73.
20. Bacer-Kermavner L, Virant-Klun I, Vrtacnik-Bokal E, Tomazevic T, Meden-Vrtovec H. Sperm selection with hyaluronan for ICSI procedures and blastocyst development. *Proceedings of the 24th Annual Meeting of the ESHRE.* Barcelona, Spain. 7-9 July 2008. P-391.
21. Petersen C, Vagnini L, Baruffi R, Mauri A, Ricci J, Oliveira J, et al. Hyaluronic acid binding assay is not efficient to select spermatozoa without DNA damage. *Proceedings of the 24th Annual Meeting of the ESHRE.* Barcelona, Spain. 7-9 July 2008. O-215.
22. Oliveira J, Petersen C, Mauri A, Massaro F, Felipe V, Baruffi R, et al. Hyaluronic acid binding assay is not efficient to select motile spermatozoa with normal nuclear morphology. *Proceedings of the 24th Annual Meeting of the ESHRE.* Barcelona, Spain. 7-9 July 2008. O-260.
23. Nijs M, Creemers E, Cox A, Vanheusden E, Franssen K, Omebelet W. Relationship between hyaluronic acid binding assay and outcome in ART: a prospective randomized study. *Proceedings of the 24th Annual Meeting of the ESHRE.* Barcelona, Spain. 7-9 July 2008. O-262.
24. Yagci A, Murk W, Stronk J, Huszar G. Human zona pellucida and hyaluronic acid are comparable in selection power for spermatozoa with normal chromatin structure: an acridine orange study. *Proceedings of the 24th Annual Meeting of the ESHRE.* Barcelona, Spain. 7-9 July 2008. P-284.
25. Jean M, Barriere P, Mirallie S. Intracytoplasmic sperm injection without polyvinylpyrrolidone: an essential precaution? *Human Reprod.* 1996;11:2332.