

Validez de un sistema óptico con contraste de Hoffman en la selección de espermatozoides morfológicamente normales

Sergio Rovira^a, Olga Cairó^a, Arturo Brassesco^a, Felipe del Río^a, Laura Prats^a, María Rodríguez^a, Rafael Lafuente^b y Mario Brassesco^c

^aLaboratorio de Fecundación in vitro. Centro de Infertilidad y Reproducción Humana. Barcelona. España.

^bLaboratorio de Andrología. Centro de Infertilidad y Reproducción Humana. Barcelona. España.

^cDirección Médica. Centro de Infertilidad y Reproducción Humana. Barcelona. España.

RESUMEN

Objetivo: Al realizar una inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) se seleccionan los mejores espermatozoides presentes en la muestra, esto es, los de mejor calidad. El objetivo de este estudio es valorar la precisión de un sistema óptico con contraste de Hoffman en cuanto a la selección espermática al compararlo con un microscopio de alta magnificación.

Material y métodos: Se estudiaron muestras de semen de 20 pacientes sometidos a tratamiento de fecundación in vitro. Todas las muestras tenían más de 10⁶ espermatozoides de grado A/ml. Se seleccionaron 10 espermatozoides de cada muestra a 400 aumentos mediante un microscopio invertido utilizado normalmente para ICSI, y esos espermatozoides fueron evaluados nuevamente utilizando un microscopio de alta magnificación en función de su patrón de vacuolación (grados de I a IV). Los grados I y II se consideraron de buena calidad y los grados III y IV de baja calidad (vacuolación anormal).

Resultados: Al comparar con el microscopio de alta magnificación, sólo el 27% (n = 54) de los espermatozoides seleccionados como "normales" con el microscopio de 400 aumentos fueron considerados de buena calidad, mientras que el 73% restante (n = 146) presentaba un patrón de vacuolación anormal.

Discusión: Aunque el tamaño de la muestra es reducido, se observa una correlación muy débil entre los 2 test. La tasa tan elevada de falsos positivos (73%) sería consecuencia de la limitación del sistema óptico utilizado en la selección de los espermatozoides. Aun cuando la valoración de las muestras fue realizada por el mismo operador, se utilizó un método de evaluación objetivo que minimizaba el sesgo de verificación. Queda pendiente la evaluación del impacto de estos resultados, tanto en el desarrollo embrionario como en las tasas de aborto e implantación.

Palabras clave: IMSI. Vacuolas. Espermatozoides. Alta magnificación.

ABSTRACT

Accuracy of a Hoffman-based optic system for the selection of morphologically normal spermatozoa

Objective: When an intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is performed, the maximum number of good quality spermatozoa is selected. The objective of this study was to assess the accuracy of the selection of "normal" spermatozoa by a standard Hoffman-based optic system compared with a high-magnification microscope.

Material and methods: Samples from 20 patients undergoing an in vitro fertilization (IVF) technique were studied. All samples were over 10⁶ grade A spermatozoa/ml. Ten spermatozoa from each sample were selected at 400 X using a standard inverted microscope (normally used for ICSI) and were re-assessed using a high-magnification microscope (used for intracytoplasmic morphologically-selected sperm injection). Spermatozoa were assessed depending on their vacuolization pattern (grades I to IV). Grades I and II indicate good quality spermatozoa, while grades III and IV indicate low quality (abnormal vacuolization).

Results: Compared with spermatozoa selected with a high magnification microscope, only 27% (n=54) of spermatozoa selected as "normal" with the 400 X microscope were considered good quality, while the remaining 73% (n=146) showed an abnormal vacuolization pattern.

Discussion: Although the sample size was small, we found a poor correlation between the two tests. The high rate of false positive results (73%) could be due to the limitations of the optic system used to select spermatozoa. Even when the samples were assessed by the same operator, we used an objective evaluation method that minimized the verification bias. Evaluation of the impact of these results on embryo development and implantation and miscarriage rates is still pending.

Key words: IMSI. Vacuoles. Spermatozoa. High magnification.

Correspondencia: Dr. S. Rovira.

Plaza Eguilaz, 14, bajos. 08017 Barcelona. España.

Correo electrónico: srovira@cirh.es

INTRODUCCIÓN

La mitad del material genético del embrión proviene del espermatozoide, por lo que seleccionar el mejor espermatozoide es vital para el éxito de las técnicas de reproducción asistida.

Desde que en 1992 Palermo et al¹ publicaron sus primeros embarazos mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), ésta ha resultado ser una técnica muy útil y ampliamente extendida en los laboratorios de fecundación in vitro (FIV) para parejas con un factor masculino, ya que únicamente es necesario un espermatozoide para cada óvulo. La ICSI se realiza en microscopios invertidos dotados generalmente de un sistema óptico con contraste de Hoffman, que permite aumentar los espermatozoides hasta 400 veces, escogiendo aquellos con mejor morfología y movilidad.

El espermatozoide maduro ideal, según la Organización Mundial de la Salud², corresponde a una célula de cabeza ovalada de contorno regular, con una parte anterior correspondiente al 40-70% del área de la cabeza, el acrosoma, y una región posterior más oscura. La base de la cabeza debe ser amplia, con sólo una cola. La cola debería estar insertada simétricamente en la fosa de la base de la cabeza e inmediatamente detrás de la cabeza aparece la pieza intermedia, que debe ser algo más gruesa que la cola.

Incluso pequeñas diferencias geométricas en la morfología de la cabeza pueden provocar modificaciones hidrodinámicas del espermatozoide afectando a su funcionalidad, de lo cual se desprende la necesidad de realizar una selección lo más cuidadosa posible.

A pesar de todo, los 400 aumentos que se consiguen mediante los sistemas basados en la óptica Hoffman no permiten visualizar las vacuolas presentes en la cabeza de la mayoría de los espermatozoides. La presencia de vacuolas es básica para poder valorar la correcta formación del espermatozoide, dado que una incorrecta espermatogénesis o condensación del genoma en el epidídimo se traduce en un núcleo espermático vacuolado o defectos en la morfología externa³.

La morfología espermática se puede evaluar de una forma mucho más precisa mediante un microscopio invertido equipado con óptica Nomarski o contraste interdiferecial (magnificación a 1.000× bajo aceite mineral) con un sistema digital que puede alcanzar una magnificación de más de 13.000×. De esta forma, siguiendo los criterios de estudio de la morfología de orgánulos en espermatozoides móviles (MSOME)^{4,5}, los núcleos espermáticos de forma normal serían los que tienen una configuración oval, simétricos, homogéneos, sin desórdenes regionales y conteniendo no más de 1 vacuola (de un diámetro de $0,78 \pm 0,18 \mu\text{m}$) (fig. 1).

Así, en el año 2005 se presentaron los primeros embarazos mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI)⁶, técnica resultante de realizar una MSOME y posterior inyección de esos espermatozoides morfológicamente seleccionados en un ovocito (MSOME + ICSI = IMSI).

La presencia vacuolar se relaciona directamente con un posible daño en el ADN espermático, ya sea produciendo su desnaturalización y/o fragmentación, o provocando un efecto negativo en el desarrollo embrionario⁷⁻¹⁰. La estabilidad de la cromatina parece que influye en el desarrollo embrionario. Se ha demostrado en bovinos que la utilización de esperma con vacuolas afecta la viabilidad de los embriones.

Vista la importancia diagnóstica de las vacuolas nucleares de los espermatozoides, hay que plantearse si los sistemas actuales de selección son todavía válidos, o si, por el contrario, una selección a 400× es insuficiente para seleccionar los espermatozoides con mejor morfología y, en consecuencia, menos vacuolados.

El objetivo de este estudio es validar la selección de espermatozoides realizada a 400 aumentos ópticos con un microscopio convencional de ICSI dotado con óptica Hoffman, utilizando para ello un microscopio de IMSI de contraste interdiferecial (DIC), capaz de realizar la selección a 1.600 aumentos ópticos y a más de 13.000 aumentos gracias a un VarioZoom digital de alta sensibilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron muestras de semen de 20 pacientes no seleccionados sometidos a tratamiento de FIV, las

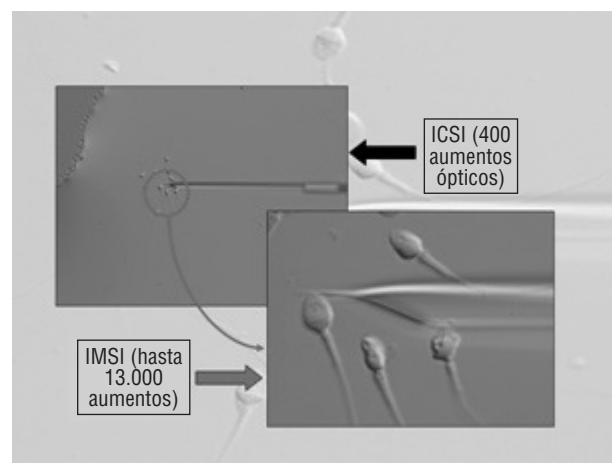


Figura 1. Apariencia de los espermatozoides observados a 400 aumentos en condiciones de ICSI (izquierda) y a 13.000 aumentos en condiciones de IMSI (derecha).

cuales tenían como mínimo una concentración de 10^6 espermatozoides grado A/ml. Se escogieron 10 espermatozoides de cada muestra (de morfología y movilidad normales) utilizando un microscopio Olympus IX50, en condiciones estándar de ICSI (objetivo de $40\times$, contraste de Hoffman).

Posteriormente, esos 10 espermatozoides se evaluaron de nuevo utilizando un microscopio invertido LEICA AM6000 en condiciones estándar de IMSI (objetivo de inmersión de aceite $100\times$, lente multiplicadora $1,6\times$, DIC). Los espermatozoides se evaluaron, además de por su morfología, por su patrón de vacuolización⁵. Así, espermatozoides sin vacuolas se consideraron de grado I, si tenían 2 o menos vacuolas de grado II, con una vacuola grande de grado III y si tenían una vacuola grande y otras anomalías de grado IV. Los grados I y II se consideraron espermatozoides de buena calidad, y los grados III y IV se consideraron espermatozoides anormales (fig. 2).

Tanto la selección en condiciones de ICSI como la posterior validación en condiciones de IMSI fueron realizadas a temperatura ambiente, a fin de ralentizar el metabolismo de los espermatozoides y evitar que se vacuolasen.

RESULTADOS

De los 100 espermatozoides considerados inicialmente de buena calidad al seleccionarlos en condiciones de ICSI, sólo el 27% ($n = 54$) resultaron ser de grado I o II. El 73% ($n = 146$) restante fue considerado espermatozoide de mala calidad al evaluar su patrón de vacuolización.

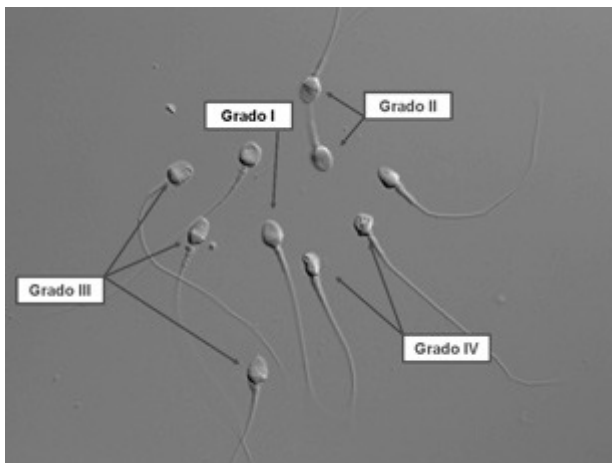


Figura 2. Diferentes espermatozoides separados por su grado de vacuolización, según la clasificación propuesta por Vanderzwalmen et al⁵.

DISCUSIÓN

Se ha obtenido un 73% de falsos positivos, es decir, espermatozoides considerados normales a $400\times$ con contraste de Hoffman que se revelaron anormales por su patrón de vacuolización al reestudiarlos a 1.600 aumentos ópticos con DIC. Este porcentaje tan elevado es consecuencia de la limitación óptica del contraste de Hoffman.

A 400 aumentos se puede descartar la gran mayoría de malformaciones de los espermatozoides, aunque las vacuolas son indetectables. El hecho de que se haya relacionado la presencia de vacuolas de gran tamaño con el daño en el ADN espermático¹¹ debe hacernos reflexionar acerca de la conveniencia de realizar IMSI en vez de ICSI siempre que sea posible, a fin de evitar la transmisión a la descendencia de posibles alteraciones genéticas presentes en el genoma paterno.

A pesar de todo, todavía hay controversia acerca de si la realización de la IMSI es una técnica igualmente útil para cualquier paciente. La utilidad de la alta magnificación está relacionada con grupos muy concretos de pacientes, con determinadas patologías como ADN espermático fragmentado, fallos repetidos de implantación y abortos de repetición. Además, no siempre es posible realizar esta técnica en el laboratorio de reproducción asistida, ya que es necesario una concentración umbral por debajo de la cual la dificultad de encontrar espermatozoides móviles y normales hace inviable la aplicación de la técnica.

Bibliografía

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992;340:17-8.
2. WHO. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1996.
3. Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*. 2007;1: S147-55.
4. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl*. 2002;23: 1-8.
5. 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 nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:617-27.
6. 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.
7. Junca AM, Cohen-Bacrie P, Belloc S, Dumont M, Ménéz Y. Teratozoospermia at the time of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI). *Gynecol Obstet Fertil*. 2009;37:552-7.
8. Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online*. 2007;14: 727-33.

9. Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2006; 12:19-25.
10. Bartoov B, Eltes F, Pansky M, Langzam J, Reichart M, Soffer Y. Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses. *Hum Reprod*. 1994;9:2069-75.
11. Franco JG, Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JBA, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:42-5.