

Magnificación de espermatozoides: una nueva visión del factor masculino en reproducción asistida

Olga Cairó Doncos, Laura Prats Ruiz, Sergio Rovira Fontanals, María Rodríguez Agüera, Arturo Brassesco Macazzaga, Felipe del Río Bueno, Ana Monqaut, Gemma López Granollers y Mario Brassesco Macazzaga

Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH). Clínica Corachán. Barcelona. España.

RESUMEN

En los últimos años, varios autores han comenzado a estudiar los espermatozoides con microscopía de alta magnificación. Todos ellos encuentran una clara relación entre la presencia de vacuolas en la cabeza de los espermatozoides y las tasas de embarazo y aborto, así como con un aumento en el porcentaje de fragmentación del ADN. De hecho, la morfología espermática y la presencia o no de vacuolas nucleares parece ser un reflejo del estado fisiológico de los espermatozoides.

Recientemente, el Centro de Infertilidad y Reproducción Humana de Barcelona ha adquirido un microscopio para alta magnificación, con la intención de utilizarlo de manera rutinaria para diagnóstico morfológico espermático y en la denominada inyección intracitoplasmática de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI). Se han diseñado diferentes estudios: el efecto de los antioxidantes sobre la disminución de las vacuolas espermáticas, qué técnica de preparación del semen selecciona un mayor porcentaje de espermatozoides no vacuolados, etc.

Nuestro objetivo ha sido incorporar una nueva herramienta para profundizar en el conocimiento del espermatozoide humano y mejorar tanto en el diagnóstico del factor masculino como en los resultados de las diferentes técnicas de reproducción asistida.

Palabras clave: Magnificación. Vacuolas nucleares. Morfología espermática.

ABSTRACT

Sperm magnification: a new approach to the male factor in assisted reproduction

In recent years, several studies have analyzed spermatozoa using high magnification microscopy. All these studies have found a clear link between the presence of vacuoles in the head of spermatozoa and pregnancy and abortion rates, as well as an increase in the percentage of DNA fragmentation. Indeed, sperm morphology and the presence or absence of nuclear vacuoles seems to reflect the physiological state of spermatozoa.

The Barcelona Center for Infertility and Human Reproduction recently acquired a high-magnification microscope for routine use in diagnosis and intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI). Several research studies have been designed; among the aims of these studies are to determine the effect of antioxidants on reduction of spermatid vacuoles and identify which sperm preparation technique yields the highest percentage of spermatozoa with the lowest number of vacuoles, etc.

Our goal was to incorporate a new tool to deepen knowledge of human spermatozoa and to improve both diagnosis of the male factor and the results of the various assisted reproduction techniques used in the laboratory.

Key words: Magnification. Nuclear vacuoles. Sperm morphology.

INTRODUCCIÓN

Desde que Bartoov et al¹, en el año 2003, publicaran sus resultados con la alta magnificación de espermatozoides (MSOME, *high magnification motile sperm organelle morphology examination*), varios autores se han ido sumando a la observación a grandes aumentos del espermatozoide humano. El objetivo de estos trabajos es conseguir una mejor selección espermática para aumentar las tasas de implantación, reducir las de aborto y resolver problemas de infertilidad que aparentemente son inexplicables.

En este primer trabajo, Bartoov et al¹ consiguen una tasa de embarazo del 66% cuando se realizan una IMSI (*intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*) o ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) modificada, frente a un 30% cuando realizan una ICSI convencional. Las parejas que seleccionan para IMSI tienen, al menos, 2 fallos de implantación previos en 2 ICSI consecutivas. Las pacientes son menores de 37 años, y en el último ciclo de ICSI tuvieron más de 3 ovocitos metafase II. Para realizar el estudio emparejan pacientes de IMSI con pacientes de ICSI utilizando, como criterio de selección, el número previo de ICSI fallidas.

Posteriormente, Berkovitz et al (2005², 2006³) demuestran que los espermatozoides con un núcleo normal, que han sido seleccionados morfológicamente y microinyectados, aumentan las tasas de implantación y embarazo, y disminuyen las tasas de aborto. A su vez, concluyen que la inyección de espermatozoides con grades vacuolas disminuye sensiblemente las tasas de embarazo, aumentando también las de aborto.

Por otro lado, Vanderzwalmen et al⁴, en 2008, proponen una clasificación de los espermatozoides basada en la presencia, número y tamaño de las vacuolas, relacionando su efecto en la formación de blastocistos. Observan que las vacuolas no afectan a la fecundación ni a la calidad embrionaria en día +2, pero sí a la capacidad para formar blastocistos. Demuestran el efecto tardío de las vacuolas sobre el embrión. Parece que éstas alteran, de alguna manera, el empaquetamiento del ADN. Este efecto tardío es ratificado en trabajos posteriores de Bartoov et al⁵.

Este efecto deletéreo de las vacuolas sobre el ADN espermático lo confirman Franco et al⁶ en 2008, cuando demuestran que la presencia de vacuolas en el citoplasma espermático está directamente relacionada con un aumento del porcentaje de fragmentación del ADN. Estudios posteriores, en 2009, confirman el daño producido por las vacuolas sobre el ADN de los espermatozoides, ya sea desnaturalizándolo o fragmentándolo, y alterando el desarrollo embrionario,

aunque todavía no se conocen exactamente los mecanismos de actuación⁷.

Todos estos trabajos nos llevan a afirmar que los buenos resultados obtenidos con la IMSI se pueden explicar porque parece haber una correlación entre la observación de la morfología espermática con alta magnificación y el estado fisiológico del espermatozoide. De hecho, la función mitocondrial, el estado de la cromatina y la tasa de aneuploidías es sensiblemente mejor en los espermatozoides que carecen de vacuolas en su citoplasma⁸.

A la vista de los resultados, en nuestro centro, Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH), decidimos adquirir un microscopio para realizar alta magnificación. Así, tras la incorporación de dicho microscopio como equipo de trabajo diario en nuestro laboratorio, se plantearon y diseñaron toda una serie de estudios que permitieran profundizar en el conocimiento y diagnóstico del factor masculino. Este microscopio permite una visión muy cercana y detallada del espermatozoide, mostrando su citoplasma hasta 12.000 veces aumentado, pudiéndose observar claramente sus estructuras, la presencia o no de vacuolas, número y tamaño y, evidentemente, la morfología de la cabeza, pieza intermedia y cola del espermatozoide.

DESARROLLO

Para la alta magnificación de espermatozoides y la IMSI nuestro centro utiliza el microscopio AM6000 desarrollado por Leica. Permite el *screening*, selección e inyección de los espermatozoides en una única estación de trabajo. Se trata de un microscopio totalmente automatizado, con 2 micromanipuladores eléctricos integrados, y cuyas funciones pueden controlarse a través de un *software*. Permite también la grabación de varias posiciones de la platina, detalle fundamental para la realización de la IMSI, al trabajar a grandes aumentos.

La alta magnificación se consigue con la "óptica" DIC (contraste interdifereencial). Sistema, también, totalmente automatizado que con el uso de distintos prismas y filtros polarizantes permite obtener imágenes tridimensionales de alta resolución y contraste. El microscopio tiene 2 objetivos de inmersión de 20 y 100 aumentos. Con este último obtenemos una imagen óptica de 1.000 aumentos o 1.600 al incorporar una lente suplementaria de 1,6×. Adosado al microscopio, el zoom continuo (vario zoom) nos proporciona imágenes de gran calidad de 12.000 aumentos digitales. Esto abre nuevas posibilidades para juzgar la calidad de los espermatozoides.

Todo el sistema está dotado de parafocalidad, lo que asegura siempre una imagen nítida cuando cam-

biamos de un objetivo e incluso cuando cambiamos de inmersión a seco.

Uno de los primeros estudios que nos planteamos en CIRH fue demostrar que realmente escogemos los espermatozoides de mejor calidad cuando realizamos la selección a 1.000× que cuando lo hacemos a 400×. Esta última es la forma habitual de trabajar cuando realizamos una ICSI convencional. Para el estudio se utilizaron muestras de semen de pacientes en tratamiento de fecundación in vitro (FIV) con un recuento superior a 10^6 espermatozoides/ml. Los espermatozoides se seleccionaron primero a 400× utilizando un microscopio invertido Olympus IX50 y seguidamente se reestudiaron utilizando el microscopio AM6000. Los espermatozoides se valoraron en función de su patrón de vacuolización: grado I, forma de la cabeza normal y sin vacuolas; grado II, forma normal y menos de 3 vacuolas pequeñas; grado III, forma normal y más de 2 vacuolas pequeñas o 1 grande; grado IV, una vacuola grande y forma anormal de la cabeza u otras anomalías (Vanderzwalmen, 2008)⁴. Los espermatozoides de grados I y II se consideran de buena calidad, mientras que los de grados III y IV son considerados de baja calidad.

Cuando realizamos una selección de espermatozoides para una ICSI a 400×, consideramos que todos ellos son de buena calidad. Pero, en este trabajo, cuando reestudiábamos los espermatozoides seleccionados con el microscopio de alta magnificación, únicamente el 27% de los inicialmente considerados normales eran de grados I y II, mientras que el 73% restante presentaba un patrón de vacuolización considerado de mala calidad. Quedan por tanto demostradas las limitaciones que presenta el sistema óptico a 400×, ya que no permite la correcta valoración de la estructura nuclear del espermatozoide.

Este primer estudio de morfología espermática se realizó en el laboratorio de FIV, para comprobar la utilidad del nuevo microscopio en la selección de espermatozoides para microinyectar. Paralelamente, en el laboratorio de andrología compararon los resultados obtenidos al evaluar la morfología espermática de unas mismas muestras por la técnica tradicional de tinción Diff-Quik y la microscopia de alta magnificación. Se evaluó el porcentaje de espermatozoides normales en muestras teñidas y fijadas siguiendo el criterio estricto de Kruguer a 400×. Los resultados se compararon con los obtenidos tras determinar las características morfológicas de la cabeza del espermatozoide a 8.000 aumentos. Se dividieron las muestras en 2 grupos: *a*) con morfología normal (> 15% formas normales según la Organización Mundial de la Salud), y *b*) teratozoospermicas (< 15% formas normales). En ambos grupos, el porcentaje de espermatozoides con

formas normales fue significativamente menor ($p = 0,05$) cuando se realizó el conteo mediante microscopia de alta magnificación, demostrándose así como un método de diagnóstico mucho más preciso.

En nuestro centro se congelan muestras de semen de manera rutinaria: tanto sémenes de donantes para banco como muestras de pacientes que se someten a ciclos de FIV, pacientes oncológicos, etc. Hasta ahora teníamos claro que el proceso de congelación y descongelación afectaba básicamente al porcentaje de espermatozoides móviles, pero no sabíamos si este proceso, ni en qué grado, podía afectar al citoplasma espermático. Así, decidimos comparar y evaluar el efecto de la congelación sobre la integridad de la cabeza, analizando la presencia de vacuolas nucleares en muestras de semen de donantes, antes y después de la congelación. Las muestras se congelaron tras capacitarlas. Después de realizar un test de magnificación a todas las muestras, pre y poscongeladas, observamos que la congelación provocaba una disminución en el número de espermatozoides sin vacuolas y un aumento del número de espermatozoides grados III y IV.

Igualmente, nos pareció interesante comparar los patrones de vacuolización de los espermatozoides entre muestras normozoospermicas y oligozoospermicas. Para ello, analizamos 100 espermatozoides en cada muestra y los clasificamos según el modelo propuesto por Vanderzwalmen. Analizamos un total de 60 muestras, de las que 30 fueron normozoospermicas (≥ 20 millones/ml) y 30 oligozoospermicas (< 20 millones/ml). En este caso, el estudio realizado en el microscopio de alta magnificación no reveló ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los patrones de vacuolización de los tipos de muestras. Lo que sí observamos fue que en la mayoría de estas muestras, de pacientes que llegaban al laboratorio de FIV para realizarse un ciclo de FIV-ICSI, al menos el 60% de espermatozoides era de grados III y IV.

Uno de los estudios más notables que hemos realizado en nuestro centro es la comparación de la calidad seminal obtenida, tras la preparación de muestras con la técnica de gradientes de densidad y el Swim Up. Para ello analizamos la estructura nuclear con alta magnificación. Se estudiaron muestras de semen de 53 pacientes que acudieron al CIRH para realizar un tratamiento de fertilidad. Entre otros análisis, se realizó un test de magnificación a cada muestra, antes y después de ser procesada por las 2 técnicas, clasificando los espermatozoides según su grado de vacuolización. Las 2 técnicas fueron efectivas para seleccionar los mejores espermatozoides, ya que en ambos casos las muestras poscapacitadas pre-

sentaban una mayor proporción de espermatozoides grados I y II y una menor proporción de grados III y IV que en las muestras sin capacitar. Estas diferencias eran mayores cuando se capacitaba con Swim Up. El análisis estadístico (test de Wilcoxon) entre las técnicas reveló que con el Swim Up se obtenía una mayor proporción de espermatozoides de buena calidad (grados I y II) que con los gradientes de densidad y que esta diferencia era estadísticamente significativa. Con en Swim Up obteníamos un 59,29% de espermatozoides grado I+II mientras que con los gradientes un 15,67% ($p < 0,0001$). Por tanto esta importante disminución en el número de espermatozoides vacuolados, y probablemente de la fragmentación del ADN, debería ser tomada en cuenta en la elección de las distintas técnicas de preparación de semen para reproducción asistida. Actualmente, este estudio está pendiente de publicación en la revista *Fertility and Sterility*.

La alta magnificación de espermatozoides también nos ha permitido estudiar el efecto de los antioxidantes en la vacuolización de la cabeza del espermatozoide humano. Se trataron, durante 1 mes, a 33 pacientes de infertilidad idiopática, con un complejo multivitamínico que contenía L-carnitina, coenzima Q10 y vitaminas C, E y B₁₂. Las muestras de semen se estudiaron antes y después del tratamiento. Tanto la vacuolización como la fragmentación del ADN espermático disminuyeron de manera importante después del tratamiento. Estas diferencias eran estadísticamente significativas. Por tanto, este estudio nos revela que algo tan simple como un tratamiento con antioxidantes puede mejorar los resultados de las técnicas de reproducción asistida. Este trabajo también está pendiente de su publicación.

Pero, sin duda, una de las aplicaciones más importantes del microscopio de alta magnificación es la IMSI. Con esta técnica podemos seleccionar los mejores espermatozoides para microinyectar, los que presentan una mejor morfología y, si es posible, con ausencia de vacuolas. Para la IMSI se procede de la misma manera que para la ICSI en cuanto a la obtención de los ovocitos y preparación de la muestra de semen.

Una vez procesada la muestra de semen, se prepara la placa para la IMSI. Para ello se dispensan 3 gotas de polivinilpirrolidona (PVP clinical grade, Medicult, Dinamarca) en el centro de la placa. En una de ellas colocaremos 1 µl de muestra. Alrededor de ésta se colocan las gotas de SynvitroICSIHolding (Medicult, Dinamarca) donde posteriormente irán los ovocitos para ser microinyectados con los espermatozoides seleccionados. La placa se cubre con aceite de parafina (Medicult, Dinamarca) previamente equilibrado. Se

utilizan placas de Petri con base de vidrio (Willco-Dish® HBST-5040, Willcowells, Países Bajos) necesarias para poder trabajar con óptica DIC. Toda la selección espermática se realiza en frío para evitar la formación de vacuolas y obtener el máximo rendimiento a los objetivos de inmersión.

El sistema motorizado de micromanipulación Eppendorf, acoplado al microscopio, permite la colocación de una micropipeta para cazar e inmovilizar los espermatozoides y microinyectar los ovocitos. A 20× y en inmersión, se procede a la colocación de la micropipeta y a la programación de las posiciones para cazar y guardar los espermatozoides seleccionados. Hecho esto, pasamos a 100×, donde podremos seleccionar espermatozoides móviles con la mejor morfología y con ninguna o escasas vacuolas (1 o 2 pequeñas. Menos del 4% del volumen total de la cabeza). Los espermatozoides se seleccionan de la microgota de PVP que los contiene y se guardan inmovilizados en otra de las gotas de PVP. Los espermatozoides escogidos se cazan móviles y se inmovilizan tocando la parte más distal de la cola, para no dañar el cuello. Es en el momento de la microinyección cuando se da un golpe en el cuello del espermatozoide para que se favorezca la activación en el ovocito de todo el proceso de la fecundación.

Una vez terminada la selección se procede a la inyección de los ovocitos como en una ICSI convencional a 37 °C. Seguidamente los ovocitos microinyectados se cultivan en IVF de Medicult, a 37 °C y al 5% de CO₂ hasta 16-18 h, cuando valoraremos la fecundación.

Desde que iniciamos esta técnica hemos realizado 88 ciclos de IMSI. La tasa de embarazo por ciclo se sitúa en el 44% y por *transfer* en el 46,7%. Estas cifras son similares a las obtenidas en los ciclos de ICSI clásica (el 50,9 y el 51,0%). Estos resultados corresponden a la media obtenida durante el año 2009. Pero es en la tasa de aborto donde realmente mejoran nuestros resultados. En estos 88 ciclos es del 9,4%, mientras que en la ICSI es de alrededor del 15%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por los autores antes citados sobre el efecto tardío de las vacuolas en el embrión humano.

CONCLUSIONES

Durante mucho tiempo al factor masculino no se le ha dado la suficiente importancia. Cuando una pareja se presentaba en una consulta de reproducción, la mujer era siempre el mayor foco de atención. A ella se le realizaban todo tipo de estudios, mientras que al varón únicamente un seminograma. De hecho, toda-

vía hoy en muchos centros de reproducción la presencia de un andrólogo se considera un lujo.

Aunque el citoplasma ovocitario es el único presente en las primeras etapas embrionarias, resulta evidente que el espermatozoide contribuye con el 50% en el desarrollo del futuro embrión y su estudio profundo nos conduce a unas mayores tasas de embarazo y de niño en casa. Muchas esterilidades de origen desconocido dejan de serlo cuando nos acercamos al espermatozoide.

Hoy en día, para establecer un correcto diagnóstico del factor masculino es necesario una buena anamnesis, una exploración genital, una ecografía escrotal, un mínimo de 2 seminogramas de 2 eyaculados diferentes, un *screening* genético y determinaciones hormonales basales. Además, podemos añadir un estudio de magnificación que nos permitirá valorar con mucha más precisión la necesidad de realizar una FIV convencional, una ICSI, una IMSI o buscar otras alternativas. Si a todo esto añadimos un estudio de fragmentación del ADN, podremos ser mucho más precisos al diagnosticar los problemas de fertilidad de nuestros pacientes y, por tanto, darles soluciones mucho más ajustadas a su problema.

La utilidad de un microscopio de alta magnificación, por tanto, es evidente. La inversión, para un centro de técnicas en reproducción asistida, es importante, pero nos proporciona una nueva herramienta diagnóstica y permite seleccionar los mejores espermatozoides para obtener los mejores embriones y los mejores resultados en tasa de embarazo y niño en casa.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Dr. R. Lafuente por permitirnos acceder a todos los trabajos y estudios realizados en el Laboratorio de Andrología, así como a la Dra. C. Zavaleta por mostrarnos los resultados de sus estudios.

Bibliografía

1. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, et al. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril*. 2003;80:1413-9.
2. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, et al. The morphological normalcy of sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod*. 2005;20:185-90.
3. Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod*. 2006;7:1787-90.
4. 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. *RBM Online*. 2008;17:617-27.
5. Bartoov B, Eltes F, Lederman H, editores. High magnification morphological selection of individual sperm cells for IVF-ICSI. Barcelona, Spain: Abstracts of the 24th Annual Meeting of ESHRE; 7-9 July 2008.
6. Franco JG, Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JBA, Vagnini L. Significance of large nucleolar vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *RBM Online*. 2008;17:42-5.
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. Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, et al. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *RBM Online*. 2008;17:610-6.