

Anomalías en la implantación cabeza-cuello del espermatozoide y sus consecuencias durante el clivaje embrionario

Constanza Branzini,¹ Gabriel Fiszbajn,¹ Florencia Nodar,¹ G. Maggiotto,¹ Héctor Chemes,² Vanesa Rawe,^{1*}

Presentado para optar al premio Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva. Año 2007.

1) Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGyR), Buenos Aires– Argentina. - 2) Laboratorio de Fisiología y Patología Testicular, Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires – Argentina. Reproducción 2008;23:15-20

Introducción

En la actualidad las modernas técnicas de biología molecular y celular han permitido estudiar la complejidad del funcionamiento de la célula. En este último tiempo especial interés ha tenido el estudio de la morfología espermática para lograr una adecuada selección de espermatozoides y permitir alcanzar resultados exitosos en tratamientos de fertilización asistida. La morfología espermática es uno de los más importantes parámetros de selección y se correlaciona con el potencial de fertilidad. Varios modelos animales y estudios de fertilización *in vitro* en humanos (Kruger y col., 1986; Oehninger y col., 1996; De Vos y col., 2003) indicaron que la morfología anormal (teratozoospermia) de los espermatozoides puede afectar drásticamente la fertilización, desarrollo embrionario e implantación. Sin embargo, la aparición de la técnica de ICSI (Inyección Intracitoplásmica de Espermatozoides) como método de fertilización asistida trajo aparejado la controversia del papel del espermatozoide durante la fertilización, habiendo poca información disponible acerca de cómo influye la teratozoospermia en ICSI (Nagy y col., 1995; Nagy y col.; 1998; Host y col., 1999; 2001).

Los análisis seminales o *test* funcionales rutinarios utilizados en la actualidad no son capaces de identificar los factores responsables de la formación de espermatozoides defectuosos. Las deficiencias de estos métodos no revelan la patología subyacente de los espermatozoides sino sólo la manifestación secundaria (Chemes y Rawe, 2003). La evaluación de las características morfológicas utilizando microscopía de contraste de fase de gran magnificación y microscopía electrónica (ME) permite evidenciar anomalías en la porción cefálica del espermatozoide, en la pieza conectora (estructura muy importante para el clivaje embrionario), defectos a nivel del flagelo e integridad nuclear.

Se sabe que los espermatozoides humanos retienen el centríolo proximal durante la espermatogénesis, mientras que los oocitos durante la ovogénesis pierden los centríolos y retienen reservas de proteínas centrosomales (Manandhar y col., 2005; Schatten 1994; Sutovsky y col., 1999). Luego de la fusión de las gametas los componentes del centrosoma se complementan unos con otros y generan un centrosoma cigótico funcional.

El centrosoma consiste en un par de centríolos asociados con el material pericentriolar. Los centríolos exhiben un patrón clásico 9+0 de nueve tripletes de microtúbulos sin el par central y experimentan duplicación semi-conservativa en la cual la célula hija

Correspondencia: * Dra. Vanesa Y. Rawe
Viamonte 1438 (C1055ABB), Buenos Aires, Argentina
Teléfono: +54 114372-8289 - Fax: +54 114371-7275
E-mail: vrawe@cegyr.com

retiene un centriolo materno y un centriolo es formado de nuevo (Sluder y Nordberg, 2004).

El material pericentriolar comprende más de cien diferentes tipos de proteínas entre las cuales se encuentra la centrina, γ - tubulina que está directamente relacionada con la nucleación de microtúbulos y NuMA (*nuclear mitotic apparatus protein*). Esta última es una proteína nuclear de la interfase, pero se asocia al centrosoma durante el ensamblaje del huso luego de la ruptura de la envoltura nuclear (Manandhar y col., 2005).

Durante la fertilización, excepto en roedores, el centrosoma del espermatozoide (centro organizador de microtúbulos) es el que ensambla el aster de microtúbulos y recluta proteínas centrosomales del oocito dispersas por el citoplasma (Schatten, 1994), permitiendo la migración del pronúcleo femenino hacia el pronúcleo masculino a través del aster espermático usando el sistema motor de dineína. En este estadio, durante la fase pronuclear, los centriolos se duplican, formándose dos pares de centriolos equivalente a dos centrosomas, por lo tanto, los centriolos paternos son los progenitores de todos los centriolos de la descendencia (Schatten, 1994).

Luego de la aposición de los pronúcleos el centrosoma organiza los cromosomas femeninos y masculinos en placa de metafase y organiza la formación del huso bipolar durante la mitosis embrionaria (Sluder y Nordberg, 2004; Schatten y col., 1985; Palermo y col., 1997). Algunos defectos en el centrosoma derivarían en alteraciones en la formación del aster espermático con la consecuente falla de fertilización (Rawe y col., 2000; Rawe y col., 2002).

En el presente trabajo analizamos las características estructurales y funcionales de espermatozoides de un paciente con teratozoospermia severa (Índice de Kruger = 6%) que presentó falla de clivaje embrionario luego de ICSI. También se estudió la dis-

tribución de centrina en los centrosomas de las blastómeras de los embriones arrestados en interfase y se examinaron las fallas de fecundación de ciclos previos y la fisiopatología subcelular presente en uno de ellos.

Materiales y métodos

Los oocitos clasificados como no fecundados ($n = 1$) entre las 20-40 hs post-ICSI y embriones ($n = 6$) detenidos en el día 5 de incubación *in vitro* fueron estudiados para observar la distribución de tubulinas, centrinas y estructuras celulares como el flagelo espermático y material genético. Se consideraron oocitos no fecundados a aquellos en los cuales no se observaron aparición de pronúcleos bajo el microscopio de contraste de fase. El material de estudio fue otorgado al LABINEE (Laboratorio de Biología, Investigación y Estudios Especiales) por el laboratorio de embriología del CEGyR con la debida aprobación del comité de ética de la institución y con el consentimiento informado del paciente.

Obtención de espermatozoides de eyaculado para estudio de morfología

La muestra de semen se obtuvo por masturbación, con una abstinencia sexual de 2 a 5 días y obtenida como máximo una hora antes de su entrega en el laboratorio en un recipiente estéril. Se tomó la muestra de semen y se realizó un lavado de la muestra agregando igual volumen de PBS. A continuación la muestra se centrifugó a 500g durante 5 min y el precipitado fue resuspendido en PBS de manera tal que se obtuvo una concentración de 20×10^6 de espermatozoides por mililitro.

Fijación y permeabilización de oocitos y embriones

La zona pelúcida del oocito que falló en la fecundación y de los embriones detenidos se removió mediante el empleo de ácido tiroides (pH: 2,1-2,5). Luego se realizaron 4 lavados en solución de bloqueo y se incuba-

ron en una placa de un hoyo conteniendo 1 ml de solución de fijación (formaldehído al 2%) y permeabilización (Tritón X-100 1%) durante 30 minutos a 37°C. El material se lavó y posteriormente se incubó en gotas de solución de bloqueo cubiertas de aceite por 1 hora a 37°C con el fin de bloquear los sitios de unión inespecíficos (el material también puede ser bloqueado toda la noche a 4°C o bien quedar en la heladera hasta la realización de la inmunocitoquímica).

Inmunocitoquímica

El material se incubó toda la noche a 4°C o 2 hs a 37°C con el anticuerpo primario en gotas de 100 μ l cubiertas de aceite y a continuación se realizaron 4 lavados en gotas de solución de bloqueo. Luego el material se incubó 1 hora a 37°C con el anticuerpo secundario junto con RNAsa (1/10) para que el RNA no interfiera en la identificación del DNA. Esto se llevó a cabo en gotas de 100 μ l cubiertas de aceite y nuevamente se realizaron 4 lavados en solución de bloqueo. Con el fin de visualizar el ADN se realizó una incubación durante 25 minutos a 37°C con 10 μ g/ml de un intercalante de ADN, TOTO-3 junto con RNAsa (1/10) en gotas de 100 μ l cubiertas de aceite. En el caso de los oocitos que fallaron en la fecundación el ADN se visualizó luego de la incubación durante 25 min con Hoechst 33342 a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación se procedió a realizar los lavados en solución de bloqueo y los oocitos, y embriones se montaron en portaobjetos de vidrio con medio de montaje Vectashield para retardar el fotoenvejecimiento de la muestra. Los embriones detenidos se visualizaron mediante microscopio confocal Olympus (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales) equipado con rayos láser de longitud de onda 488, 543 y 633 nm. Los oocitos que fallaron en la fecundación fueron vi-

sualizados con microscopio de epifluorescencia.

Los estudios de inmunocitoquímica se realizaron por inmunofluorescencia con el uso de los siguientes anticuerpos primarios y secundarios:

- Anti- α y β tubulinas (hecho en oveja): dilución 1/200.
- Anti- α tubulinas acetiladas (hecho en ratón): dilución 1/100.
- Anti-Centrina (hecho en ratón) 20H5: dilución 1/100 (gentileza del Dr. Salisbury).
- Anti-Ig 568 nm (rojo): dilución 1/200.
- Anti-Ig 488 nm (verde): dilución 1/200.

Resultados

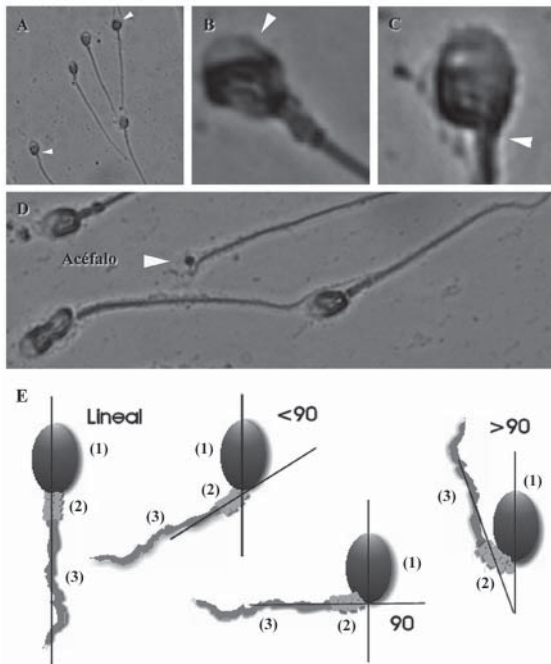
Morfología espermática por contraste de fase

El estudio de contraste de fase mostró un anormal alineamiento entre la porción cefálica y el flagelo de los espermatozoides (Figura 1A, ver flecha). También se pudieron observar acrosomas pequeños en la región apical de la cabeza de los espermatozoides (hipoplasia acrosomal), (ver flecha Figura 1A). Las Figuras 1B y 1C muestran en detalle estas anomalías cefálicas y flagelares. Debido a la fragilidad presente en la inserción cabeza-cuello, la mayoría de los espermatozoides sufren rupturas en esa zona post-centrifugado y como consecuencia se visualizan flagelos sin cabeza (Figura 1D) y cabezas sin flagelos.

El esquema de la Figura 1E representa los diferentes grados de inserción existentes entre la porción cefálica y el flagelo del espermatozoide. En (1) se representa el material genético del espermatozoide, en (2) la vaina mitocondrial y en (3) el flagelo. El espermatozoide esquematizado a la izquierda de la Figura 1E ejemplifica un normal alineamiento entre la cabeza y el flagelo. Los esquemas de la derecha representan alineaciones abaxiales con diferentes grados de inserción. La morfología de los esper-

matosoides observada en el microscopio de fase de contraste se complementó con el estudio de ME detectando un síndrome de unión defectuosa de la cabeza-pieza media con abundantes espermatozoides acefálicos e hipoplasia acrosomal parcial en un elevado porcentaje de la muestra.

Figura 1. Inserción abaxial e hipoplasia del acrosoma en espermatozoides provenientes de eyaculado (Figura 1A, B y C, ver puntas de flecha). Las Figuras 1B y 1C muestran el detalle de las anomalías cefálicas y flagelares. En la figura 1D se evidencia un espermatozoide acefálico (flecha). Esquema de espermatozoides con diferentes grados de inserción existentes entre la porción cefálica y el flagelo (Figura 1E). En (1) se representa el material genético del espermatozoide, en (2) la vaina mitocondrial y en (3) el flagelo. El espermatozoide esquematizado a la izquierda ejemplifica un normal alineamiento entre la cabeza y el flagelo. Los esquemas de la derecha representan alineaciones abaxiales con diferentes grados de inserción flagelar con respecto al eje central (90° , $>$ de 90° y $<$ de 90°).



Ciclos de reproducción asistida e inmunocitoquímica

Luego de tres inseminaciones intrauterinas y un ciclo de FIV fallidos la pareja (con una infertilidad primaria de 5 años de evolución) realizó cuatro ciclos de ICSI con gametas propias y dos ciclos más con oocitos

donados. En los dos primeros ciclos (Tabla 1, ciclo 1 y 2) se obtienen embriones con tasa de clivaje disminuida que luego detuvieron su desarrollo y cigotos que se detuvieron en el estadio de singamia.

Tabla 1. *Estudiado mediante inmunocitoquímica (ICC). 2PN: Presencia del pronúcleo masculino y del pronúcleo femenino 16 horas post ICSI (clasificación para determinar la fecundación).

Singamia: Desaparición de las envolturas de los pronúcleos masculino y femenino bajo microscopio de luz transmitida. Las envolturas pronucleares se desensamblan para permitir la formación de la primera placa de metafase del embrión.

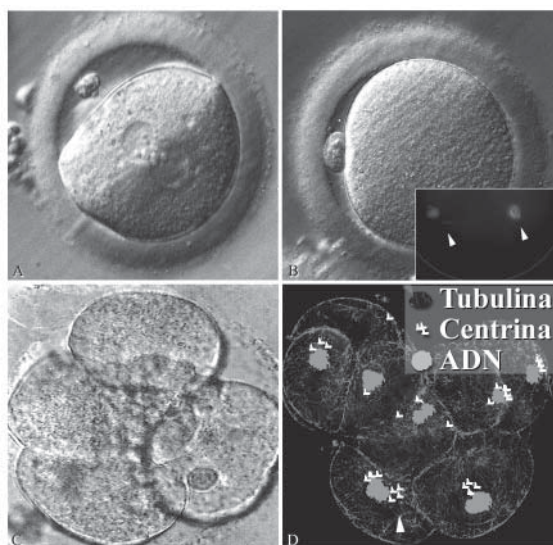
Ciclo	Técnica	Fertilización	Transferencia (día 2)	Transferencia (día 3)	Embarazo
1	ICSI (4 MII)	ICSI 3x2PN	2 embriones regular calidad y 1x2PN (Singamia)	-	Negativo
1	FIV (4 MII)	FIV 4x0PN	-	-	-
2	ICSI (8 MII)	7x2PN, 1x0PN	4 embriones de regular calidad	-	Ectópico ovárico
3	ICSI (5 MII)	4x2PN, 1x1PN	3 embriones regular calidad y 1x2PN	-	Negativo
4	ICSI (11 MII)	8x2PN, 1x3PN	4 embriones regular calidad	-	Negativo
5	Ovodonación ICSI (10 MII)	10x2PN	3 embriones Tasa normal de clivaje	-	Negativo
6	Ovodonación ICSI (6 MII)	4x2PN, 1x0PN	-	4 embriones Tasa normal de clivaje	Positivo

El resto de los embriones no transferidos continuaron con la incubación *in vitro* hasta el estadio de blastocisto, pero se observó la detención de los mismos en el día 5. En un ciclo posterior (ciclo 3) se obtuvieron 4 cigotos pronucleados luego de ICSI. En este ciclo uno de los cigotos se detuvo en el estadio de 2 pronúcleos (Figura 2A). La transferencia de los embriones (ver embrión Figura 2C) se realizó con *Assisted Hatching* y remoción de fragmentos debido a la mala calidad embrionaria, pero no se obtuvo embarazo. En el cuarto ciclo los embriones que se obtuvieron presentaron una tasa disminuida de clivaje y falta de embarazo normal. Bajo la sospecha de defectos en la porción cabeza-cuello en los espermatozoides los embriones detenidos del ciclo 4 se estudiaron por inmunocitoquímica (ICC) para analizar la distribución de la proteína centrina y la dinámica de microtúbulos (Figura

2D). Los embriones detenidos de este ciclo mostraron una distribución anómala de la proteína centrina en los centrosomas con una dispersión de la misma en el citoplasma de las blastómeras embrionarias. El patrón de microtúbulos en las blastómeras era normal en estos embriones, observándose una red de filamentos en todo el citoplasma de la célula en interfase (Figura 2D).

Ante la observación de una calidad oocitaria regular durante el procedimiento de ICSI se realizaron dos ciclos de ICSI con oocitos donados y espermatozoides cuidadosamente seleccionados para evitar las anomalías observadas. En el quinto ciclo el clivaje embrionario a las 48 horas fue normal, se transfirieron 3 embriones y se prosiguió con

Figura 2. Oocito detenido en el estadio de 2 pronúcleos (2A, microscopía de contraste de fase) y la Figura 2B muestra la Falla de Fecundación del paciente con síndrome de unión defectuosa de la cabeza-pieza media. En el recuadro se observa el estudio de ICC que evidencia ausencia de aster espermático y condensación prematura de cromosomas paternos con desprendimiento del flagelo (Recuadro Figura 2B, ver flecha). Se observa la placa metafásica oocitaria (Recuadro Figura 2B, ver flecha) y ausencia de activación oocitaria. Imagen de microscopía de contraste de fase de un embrión detenido en el día 5, evidenciándose fragmentos y blastómeras asimétricas (Figura 2C). Estudio de los embriones detenidos mediante ICC (Figura 2D). Anómala distribución de la proteína centrina de los centrosomas (Figura 2D). Se observa dispersión de centrina en el citoplasma de las blastómeras embrionarias (flecha Figuras 2D). Microtúbulos organizados en red de filamentos en todo el citoplasma de la célula.



el cultivo embrionario a blastocisto, pero los mismos detuvieron su desarrollo y fueron descartados. No se observó embarazo en este ciclo (Tabla 1, ciclo 5). En el último ciclo (ciclo 6) se obtuvieron 4 cigotos pronucleados y uno sin presencia de pronúcleos (falla de fecundación) que se estudió mediante inmunocitoquímica (Figura 2B) para analizar el patrón de microtúbulos, del material genético y del flagelo espermático en la misma. La falla de fecundación evidenció ausencia de aster espermático y presentó condensación prematura de cromosomas paternos con desprendimiento del flagelo. Las flechas indican el flagelo disociado de la cabeza del espermatozoide y la placa metafásica del oocito respectivamente (ver recuadro de la Figura 2B). Pudo observarse ausencia de activación oocitaria. Los 4 embriones obtenidos se transfirieron a las 72 horas obteniéndose embarazo que se encuentra en evolución en la actualidad (Tabla 1, ciclo 6).

Conclusiones

Durante la mitosis el huso mitótico está organizado por el centrosoma que determina la polaridad y orientación de los microtúbulos y asegura la distribución de los cromosomas durante la división (Sluder y Nordberg, 2004). Es importante considerar al centriolo proximal paterno (y futuro centrosoma del cigoto) como la estructura llave de la organización de los microtúbulos y la formación de un eficiente huso mitótico para permitir la distribución del material genético en el embrión en desarrollo.

Como se evidencia en nuestro estudio las alteraciones de inserción cuello-cabeza observadas en los espermatozoides del paciente podrían resultar en disfunciones del centriolo proximal y/o del material que lo rodea (pericentriolar), causando la formación de un aster espermático anómalo. La consecuencia de esta anomalía fue la falta de singamia y clivaje embrionario defectuoso con la consecuente falta de implantación y embarazo. Luego del estudio detallado de la patología espermática presente se realizó un diagnóstico y una mejor selección del espermatozoide a inyectar durante el ICSI. De

esta manera se caracterizaron las deficiencias estructurales y funcionales en los espermatozoides anormales y se consiguió embarazo en el último intento.

Probablemente la causa de las alteraciones en el clivaje embrionario y la distribución anormal de la proteína pericentriolar centrina en los embriones detenidos estudiados se deba principalmente a la inserción abaxial del flagelo con la cabeza de los espermatozoides del paciente (sin descartar la mala calidad oocitaria), debido a que en esta región se localiza el centriolo proximal derivando esta disfunción en la falta de implantación observada. Es importante resaltar la importancia del estudio previo al tratamiento de ICSI para que el embriólogo esté completamente informado y realice una búsqueda exhaustiva del espermatozoide en el que no estén presentes las alteraciones en la inserción cuello-cabeza y se incrementen las posibilidades de éxito en el tratamiento de ICSI.

Referencias

- **Chemes, H.E.** and Rawe, V.Y. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. (Review). Hum. Reprod. Update. (cover work), Volume 9, Issue 5, September, 405-428, 2003.
- **De Vos A.**, Van del Velde H., Joris H., Verheyen G., Devroey P., Van Steirteghem A. (2003). Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. Fertl Steril 79: 42-48.
- **Host E**, Ernst E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. (2001). Morphology of spermatozoa used in IVF and ICSI from oligozoospermic men. Reprod Biomed Online. 3(3):212-215.
- **Host E**, Lindenberg S, Ernst E, Christensen F. (1999). DNA strand breaks in human spermatozoa: a possible factor, to be considered in couples suffering from unexplained infertility. Acta Obstet Gynecol Scand. 78(7):622-625.
- **Kruger TF**, Menkveld R., Stander FSH., Lombard CJ., van der Merwe JP., van Zyl JA., Smith K. (1986). Sperm morphologic features as a pronostic factor in in vitro fertilization. Fertl Steril 46: 1118-1123.
- **Manandhar G.**, Schatten H, Sutovsky P. (2005). Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. Biol Reprod. 72(1):2-13.
- **Nagy ZP**, Liu J, Joris H, Bocken G, Desmet B, Van Ranst H, Vankelecom A, Devroey P, Van Steirteghem AC. (1995). The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. Hum Reprod. 10(12):3171-3177.
- **Nagy ZP**, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem AC. (1998). Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. Hum Reprod. 13 Suppl 1:143-154.
- **Oehninger SC.**, Kruger TF, Simon T, Jones D., Mayer J., Lanzendorf SI, Toner JP, Muasher SJ. (1996). A comparative analysis of embryo implantation potential in patients with a high insemination concentration or intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 11. 1086-1089.
- **Palermo GD**, Colombero LT, Rosenwaks Z. (1997). The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. Rev Reprod. 2(1):19-27.
- **Rawe V.Y.**, Brugo Olmedo S., Nodar F, Doncel G., Vitullo A., Chillik C., Acosta A. (2000). Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. Mol Hum Reprod. 6(6):510-516.
- **Rawe VY**, Terada Y, Nakamura S, Chillik CF, Olmedo SB, Chemes HE. (2002). A pathology of the sperm centriole responsible for defective sperm aster formation, syngamy and cleavage. Hum Reprod. 17(9):2344-2349.
- **Schatten G**, Simerly C, Schatten H. (1985). Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. Proc Natl Acad Sci U S A. 82(12):4152-4156.
- **Schatten G.** (1994). The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. Dev. Biol; 165: 229-335.
- **Sluder G**, Nordberg JJ. (2004). The good, the bad and the ugly: the practical consequences of centrosome amplification. Curr Opin Cell Biol.; 16(1):49-54.
- **Sutovsky P**, Manandhar G., Schatten G. (1999). Biogenesis of centrosome during mammalian gametogenesis and fertilization. Protoplasma; 206: 249-262.