

## Actividades académicas para Embriólogos

### Primer curso teórico-práctico de educación realizado por SAEC: ICSI (nivel inicial)

Andrea Dematteis,<sup>1</sup> Ariela Mata,<sup>2</sup> Claudio Bisioli,<sup>3</sup> Juan José Talarico,<sup>4</sup> Belén Irigoyen,<sup>5</sup> Fernanda GE Raffo<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Centro Integral de Ginecología, Obstetricia y Reproducción (CIGOR). Nueva Córdoba, Córdoba, Argentina.

<sup>2</sup> Fecundart. Nueva Córdoba, Córdoba, Argentina.

<sup>3</sup> Pregna. Buenos Aires, Argentina

<sup>4</sup> GENS. Quilmes, Buenos Aires, Argentina.

<sup>5</sup> Fertilab. Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2018;33(4):46-53

### Comité de educación SAEC: Primer paso hacia un status educacional y profesional de los embriólogos clínicos

Lic. Fernanda GE Raffo

A 40 años del primer nacimiento por reproducción asistida (RA), los centros de esta especialidad se han afirmado con éxito en el campo de la medicina. Desde los comienzos fue claro que el éxito de los tratamientos requiere no solo médicos competentes y equipamientos de laboratorio de FIV, sino también un adiestrado

staff de laboratorio. Los resultados de los procedimientos de RA están especialmente influenciados por las habilidades del personal de laboratorio para manejar equipos de alta tecnología y precisión, como también por su persistencia y paciencia en la realización de micromanipulaciones en gametos y embriones. Además, se espera que el embriólogo introduzca nuevas técnicas en la práctica de rutina y mejore los procedimientos operacionales existentes. Esto implica que el staff de laboratorio se mantenga actualizado en la lectura de literatura científica y que tenga la capacidad de interpretar y evaluar críticamente los datos informados.

El objetivo del Comité de Educación de SAEC es poder brindar a sus miembros la capa-

---

**Correspondencia:** SAEC  
Correo electrónico: [info@saec.com.ar](mailto:info@saec.com.ar)

citación necesaria en las diferentes etapas de su formación. Esto implica educación teórica y práctica en Biología Reproductiva, así como también la capacitación en otras tareas que exceden a la rutina del embriólogo: gestión general del laboratorio, investigación, documentación del paciente, preparación de informes sobre procedimientos, registros, mantenimiento de bancos criogénicos, validación de equipos, pedidos de consumibles / medios / equipos, capacitación de otros embriólogos y otro personal, etcétera.

El 15 de septiembre de 2018 se concretó la realización del Primer Curso Teórico-Práctico de Educación realizado por SAEC.

El tema tratado: **ICSI (nivel inicial)**.

Este curso que se dictó para un número limitado de alumnos (8), con una duración de 8 h, se dividió en 2 partes: teórico (3 h) y práctico (5 h).

Los temas tratados en el teórico fueron: ICSI - gameta femenina; ICSI - gameta masculina; optimización de los resultados de ICSI; ventajas y desventajas de la técnica (ver resúmenes).

El práctico consistió en: preparación del material para realizar la inyección, conocimiento de los equipos y herramientas a utilizar (microscopio, inyector, micromanipuladores, agujas), manejo y captación de espermatozoides con aguja de inyección, inyección de ovocitos maduros (manejo de aguja holding y aguja de inyección).

La colaboración de DiviLab, al permitirnos utilizar sus instalaciones, nos facilitó realizar el práctico sin la necesidad de pedir colaboración a ningún centro de reproducción.

Los miembros de SAEC que activamente participamos de este curso creemos haber cumplido con sus expectativas y nos preparamos para la próxima tarea educativa.



## Resumen: ICSI - Gameta masculina: manejo de muestras de semen y espermatozoides para ICSI. Novedades para optimizar los resultados

Lic. Andrea Dematteis

### Conceptos previos

Los espermatozoides, que tienen su origen en los túbulos seminíferos de los testículos, entran en contacto con las secreciones de las glándulas anexas para formar parte del semen en el momento de la eyaculación. Solo un 10% del semen corresponde a espermatozoides (muertos, vivos: móviles e inmóviles) y el 90% restante es líquido seminal (células epiteliales, células germinales y linfocitos).

El espermograma, que analiza el semen de manera cualitativa y cuantitativa, aporta la información sobre la situación reproductiva del paciente, y es la herramienta que tenemos los biólogos para programar el procesamiento dirigido al tipo de muestra y la selección adecuada de espermatozoides para ICSI. Este estudio debe basarse en los datos de la última versión del Manual de la OMS, que describe las técnicas de evaluación y los valores de referencia actuales.

### Antes de la ICSI

Es necesario contar con un sistema operativo que comience antes del día de la ICSI, analizando la historia clínica del paciente, serología al día, espermograma actualizado, etc., para evaluar necesidades especiales y programar el laboratorio. Si es necesario se puede llamar al paciente o entregarle las indicaciones para obtener su muestra, esto es: 1 a 5 días de abstinencia, higienizarse, recoger la muestra por masturbación en un frasco estéril y entregar la muestra

al laboratorio dentro de la hora de recolección y a temperatura ambiente, con su identificación y consentimiento necesarios. En el caso de sospechar dificultad para obtener la muestra, ausencia el día de la ICSI o ante un caso de oligozoospermia severa, se puede pedir una muestra previa y criopreservarla como respaldo.

### Día de la ICSI

Se deja licuar la muestra y se mide el volumen, se determina la viscosidad y se trata con jeringa y aguja si es necesario. Luego de homogeneizarla se evalúa la concentración y movilidad de los espermatozoides en la cámara de Makler y también de células redondas. Las técnicas de uso más frecuente para la selección de espermatozoides son el *Swim up* y los gradientes de densidad. Ambas técnicas permiten separar los espermatozoides del plasma seminal, *debris* y células redondas, y recuperar aquellos con mejor movilidad y ADN sin fragmentar. El uso de una técnica u otra depende de las características de la muestra a procesar y de la rutina y los hábitos del laboratorio.

### Procesamiento de las muestras con diferentes patologías

Entre las diversas patologías seminales son habituales las muestras con oligozoospermia severa y criptoospermia. En estos casos se puede adaptar el gradiente de densidad usando menos volumen o solo un gradiente de 50% para aislar los espermatozoides del plasma y *debris*. Cuando la concentración es demasiado baja y solo quede centrifugar la muestra, se debe tener en cuenta que ese pellet tendrá espermatozoides vivos y muertos, células redondas, *debris* y que es un ambiente tóxico para los espermatozoides, por lo que conviene diluir lo suficiente y usar la muestra lo antes posible.

En los casos de azoospermia, esta puede ser secretora u obstructiva. En estos casos se indica realizar aspiración de epidídimo / biopsia de testículo para buscar espermatozoides. La ICSI puede hacerse ese mismo día o se puede congelar la muestra en píldoras sobre hielo seco para ser usadas posteriormente. En los casos que no se encuentren espermatozoides se puede indicar congelar los óvulos o usar una muestra de donante.

Con menos frecuencia existen casos de eyaculación retrógrada, en donde el eyaculado (todo o gran parte) queda en la vejiga del paciente debido a una obstrucción del conducto eyaculador. En estos casos es importante preparar al paciente con una dieta para alcalinizar la orina durante los tres días previos a la recolección de la muestra de orina, que se procesará para aislar los espermatozoides inmediatamente.

## Nuevas metodologías

Con el objetivo de mejorar la selección de espermatozoides en algunos casos específicos se han desarrollado nuevas metodologías. Sin embargo, no hay evidencias suficientes que avalen su uso clínico. Entre estas:

- **MACS** (Magnetic Activated Cell Sorting): selección de espermatozoides por columnas de Anexina V. Estas columnas forman un campo magnético de alto poder y retienen espermatozoides que han comenzado su proceso apoptótico, mientras que los espermatozoides sanos atraviesan la columna y pueden ser elegidos para ICSI.
- **PICSI** (Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection): Esta metodología se basa en que los espermatozoides de mejor calidad tienen la capacidad de unirse al ácido hialurónico (AH), por lo que se capturan los espermatozoides retenidos en una placa de (AH) para realizar la ICSI.
- **IMSI** (Inyección intracitoplásmica de espermatozoides morfológicamente seleccionados): utiliza microscopía de ultra-alta mag-

nificación para elegir los espermatozoides a inyectar. Permite observar defectos sutiles en la morfología de los espermatozoides, como pequeñas vacuolas, defectos de cuello, acrosoma, etc.

- **ICSI** (Selección de los espermatozoides): El momento óptimo de realizar la ICSI es alrededor de 40 h desde la inducción de la ovulación de la paciente, cuando los ovocitos son ovulados fisiológicamente (la aspiración de los folículos en el quirófano ocurre un par de horas antes).

Es importante que el biólogo dedique tiempo a la selección de los espermatozoides bajo el microscopio, teniendo en cuenta la movilidad y la morfología, siendo lo más estricto posible con esta última. Se pueden separar los mejores espermatozoides con el micromanipulador en una gota de PVP, y luego colocar los ovocitos en la cápsula para ser inyectados.

Se debe tener en cuenta que cada parte del espermatozoide tiene un papel fundamental en la fertilización, el desarrollo embrionario temprano y la implantación, y que no siempre tenemos la posibilidad de elegir una morfología normal. Es importante en esos casos que el biólogo registre las características de los espermatozoides seleccionados y esto sea comunicado al médico de cabecera.

Tener en cuenta que cuando manipulamos y elegimos el espermatozoide estamos determinando en parte el éxito de esa paciente: tener criterio y dedicar tiempo y paciencia a la hora de la ICSI.

## Bibliografía sugerida

- Avendaño C, Munuce MJ, Brignardelo C y col. "Laboratorio de Andrología. Evaluación de localización Seminal". En Lancuba S, Martínez GA. Hacia una medicina basada en la evidencia científica. Editorial Ascune, 2017.
- Chemes HE, Rawe VY. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. Hum Reprod Update 2003; 9: 405-428.

- Branzini C, Fiszbajn G, Nodar F et al. Anomalías en la implantación cabeza-cuello del espermatozoide y sus consecuencias durante el clivaje embrionario. *Reproducción* 2008; 23: 15-20.
- Rawe V, Álvarez Sedó C, Uriondo H, Chemes H. Influencia de la patología espermática en reproducción asistida. *Reproducción* 2009; 24: 189-198.

## Resumen: ICSI -Gameta femenina

Lic. Ariela Mata

### Selección de los ovocitos a inyectar

Aproximadamente un 85% de los ovocitos recuperados en la aspiración folicular se encuentran en metafase II, listos para ser fertilizados. Solo los ovocitos maduros se inyectan, mientras que usualmente el resto se descarta. Los embriones derivados de ovocitos madurados in vitro muestran una mayor tasa de aneuploidías.

La **denudación de los ovocitos** implica la remoción de las capas celulares que lo recubren (corona radiada y cúmulo) para permitir la observación directa de la **madurez nuclear** y de la **morfología ovocitaria**, así como para facilitar el manejo del mismo durante las técnicas de micromanipulación. También disminuye el riesgo de contaminación con ADN materno, en aquellos casos en que se realizará un procedimiento de diagnóstico genético preimplantatorio en los ovocitos o en los embriones obtenidos de ellos. Se logra mediante la combinación de un método enzimático (hialuronidasa 80 IU/ml) seguido de un pipeteo suave con pipetas de diámetros decrecientes para completar la denudación.

El **ovocito maduro normal** es esférico, presenta un citoplasma claro, homogéneo, levemente granular y sin inclusiones. El espacio perivitelino es pequeño, y contiene un cuerpo polar no fragmentado. La zona pelúcida es esfé-

rica, clara, de grosor regular. Aproximadamente entre un 60 y 70% de los ovocitos recuperados en la aspiración folicular presentan alteraciones en la morfología, ya sea citoplasmáticas o extracitoplasmáticas. La mayoría de estas desviaciones de la morfología normal pueden representar variabilidad entre los ovocitos, más que dimorfismos de relevancia biológica. Las de mayor importancia son las agregaciones de retículo endoplásmico liso (algunos estudios las relacionan con anomalías fetales) y el aumento en el tamaño de los ovocitos. Los ovocitos gigantes son poliploides y no deben inyectarse.

### Tiempos en la inyección ovocitaria

La maduración del ovocito involucra dos procesos que deben completarse de manera coordinada para garantizar el potencial de generar un embrión viable: la maduración nuclear (reanudación de la meiosis I para detenerse en la metafase II) y la maduración citoplasmática. La **maduración nuclear** se observa luego de la decumulación teniendo en cuenta la presencia o ausencia de la vesícula germinal y del primer cuerpo polar. La **maduración citoplasmática** del ovocito implica variadas modificaciones metabólicas y estructurales necesarias para la correcta fertilización y el desarrollo embrionario. El tiempo óptimo para la inyección intracitoplasmática no ha sido establecido; sin embargo, numerosos trabajos coinciden en que la incubación de los ovocitos con las células de la corona y cúmulo previa a la ICSI podría favorecer la maduración citoplasmática y eventualmente incrementar las tasas de fertilización y embarazo.

### Degeneración ovocitaria

Es un fenómeno común que ocurre en entre el 5 y el 19% de los ovocitos inyectados. Puede observarse inmediatamente luego de retirar la

micropipeta, en forma conjunta con el derrame del citoplasma, o identificarse el día posterior a la ICSI, observándose un ooplasma oscuro y/o retraído. Puede ser inherente a la calidad ovocitaria o deberse a dificultades técnicas durante la decumulación e inyección. Algunos eventos que se relacionan con la disminución de la calidad ovocitaria y con la degeneración son la ruptura repentina de la membrana durante la inyección y la ausencia de formación del embudo de inyección. Por otra parte, la degeneración puede asociarse a problemas técnicos que causen daño al citoesqueleto (pipetas demasiado pequeñas durante la decumulación, zona pelúcida difícil de atravesar), manipulación excesiva del espermatozoide en el interior del ovocito, daño a la membrana plasmática en el sitio opuesto a la inyección, etc.

En pacientes con fallo repetido de ICSI debido a degeneración ovocitaria se recomienda el uso de ICSI asistido con láser (perforación de la zona pelúcida) y la utilización de micropipetas de diámetro reducido (3-5µm).

## Ubicación del espermatozoide y del cuerpo polar

Aunque la ubicación óptima del cuerpo polar durante la ICSI no ha sido establecida, teóricamente el huso meiótico en el ovocito en metafase II se encuentra ubicado próximo al primer cuerpo polar. La inyección del espermatozoide en hora 3:00, con el cuerpo polar en hora 11:00-12:00 o 6:00-7:00 evitaría disturbar el huso provocando anomalías en la segregación de los cromosomas o la muerte celular.

## Fallas de fertilización

La falla completa de fertilización en la ICSI ocurre entre el 1 y el 3% de los casos. Así mismo tasas bajas de fertilización (menores al 30%) pueden observarse en ciclos repetidos para algunos pacientes. Entre un 60 y 70% de los ovocitos MII que no fertilizan luego de la

inyección presentan en su interior un espermatozoide decondensado, lo que sugiere una falla en la activación ovocitaria. El resto de los casos corresponde a fallas en la decondensación del espermatozoide, condensación prematura de la cromatina espermática, defectos del huso o áster espermático o inyección incorrecta del espermatozoide.

## Bibliografía sugerida

- Balaban B, Brison D, Calderón G et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod Update* 2011; 26: 1270-1283.
- Balaban B, Barut T, Urman B. Assessment of Oocyte Quality. In: Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A, editors. *Practical Manual of in Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices*: Springer Science & Business Media; 2012.
- Rienzi L, Ubaldi F. Oocyte Retrieval and Selection. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, editors. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques* CRC press. 2012: 96-113.
- Rubino P, Viganò P, Luddi A et al. "The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects." *Hum Reprod update* 2016; 22: 194-227.
- Wikland M. Oocyte Retrieval. In: Gardner D, editor. *In vitro fertilization: a practical approach*. Informa Healthcare 2007: 117-126.

## Resumen: Ventajas y desventajas de la técnica de ICSI

Lic. Claudio Bisioli

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides no sólo ha sido una revolución en la moderna medicina reproductiva, sino que ha probado ser una de las pocas técnicas que han subsistido exitosamente a la prueba del tiempo.<sup>1,2</sup> Este indudable éxito en el tratamiento de la infertilidad masculina hizo que su práctica se extendiese: mientras que en el año 2000 la proporción de ciclos de ICSI que se realizaban a escala mundial era del 47,6%, para el año 2006

ya teníamos un 66%.<sup>3</sup> En 2016 Hans Evers, Editor en Jefe de la revista *Human Reproduction*, declaraba que<sup>4</sup> "ICSI en indicaciones inadecuadas ha evitado que al menos 25.000 parejas se embaracen".

Paul Devroey, pionero del ICSI, advertía por el 2013<sup>5</sup> que resultaba sorprendente que muchas clínicas utilizaran ICSI para todas las indicaciones, más aún cuando un estudio australiano advertía que existía mayor riesgo de defectos al nacer en las técnicas de TRA que en las concepciones naturales, especialmente en ICSI.<sup>6</sup>

¿Quiénes eran los que inicialmente se beneficiaban con ICSI? Sin duda aquellos pacientes con:

- graves déficits en la calidad del semen (oligozoospermia, astenozoospermia y teratozoospermias severas);
- azoospermia obstructiva;
- azoospermia no obstructiva;
- un ciclo de FIV previo que había resultado en una fertilización fallida o muy pobre.

Con el paso de los años las posibles indicaciones se extendieron un poco más, y a las 4 principales debimos agregar las siguientes:

- Anormalidades ultra-estructurales, Síndrome de Kartagener;
- Globozoospermia;
- Ausencia congénita de los vasos deferentes;
- Vasectomía;
- Obstrucción inflamatoria de los vasos deferentes;
- Disfunción eyaculatoria;
- Eyaculación retrógrada;
- Pacientes parapléjicos;
- Factores inmunológicos;
- Pacientes oncológicos;
- PGS o PGD con PCR/CGH/NGS;
- Ovocitos vitrificados.

En el presente son mayoría las clínicas que aplican ICSI en todos sus casos, independiente-

mente de la indicación original de infertilidad. Los argumentos a favor de hacer todo ICSI son, en general y resumiendo, los siguientes:

- Se obtienen mejores resultados con ICSI que con FIV.
- Se obtienen también mejores resultados en aquellos casos con pocos ovocitos.

Bhattacharya y colaboradores en 2001<sup>7</sup> reportaron los resultados de un importante estudio multicéntrico aleatorizado y concluyeron que el ICSI no ofrecía ninguna ventaja sobre la FIV en términos de resultados clínicos en casos de infertilidad no masculina.

En 2016 Grimstad y colaboradores<sup>8</sup> demostraron que, en 3956 ciclos de FIV convencional y 3189 ciclos de ICSI realizados en primeros ciclos con ovocitos frescos de mujeres cuyo único diagnóstico era ligadura de trompas (sin factor masculino), el uso de ICSI no mostró una mejora significativa en la tasa de fertilización y dio como resultado unas tasas de embarazo y nacidos vivos más bajas que con el uso de FIV convencional.

En el año 2011 Luna y colaboradores<sup>9</sup> demostraron que, en presencia de parámetros seminales normales, un bajo número de ovocitos no era indicación válida para hacer ICSI.

Un reporte de la SART luego de analizar 8597 ciclos con FSH elevada y 38926 ciclos con disminución de la reserva ovárica como principal diagnóstico, realizados entre 2004 y 2011, concluía en que el ICSI no estaba asociado a una mayor tasa de nacidos vivos.<sup>10</sup>

La opinión de la ASRM en 2012<sup>11</sup> acerca del uso del ICSI en los casos que no involucran un factor masculino se encuentra, a 6 años de su emisión, completamente vigente:

- El ICSI es una terapia segura y efectiva para el tratamiento de la infertilidad masculina.
- El ICSI puede aumentar las tasas de fertilización cuando es menor a lo esperado o ha

ocurrido previamente una falla de fertilización con inseminación convencional, aunque en la mayoría de los casos esto esté más relacionado con una mala estimulación ovárica (por ejemplo, en los casos de inmadurez citoplasmática).

- El ICSI para la infertilidad inexplicada no mejora los resultados clínicos.
- El ICSI para bajo rendimiento de ovocitos y edad materna avanzada no mejora los resultados clínicos.
- El uso rutinario de ICSI puede disminuir la incidencia de fertilización fallida inesperada; sin embargo, más de 30 parejas tendrían que someterse a ICSI innecesariamente para evitar una fecundación fallida.
- El ICSI puede ser beneficioso para pacientes sometidos a FIV con PGT, ovocitos madurados in vitro y ovocitos criopreservados.
- Debe considerarse la seguridad y el costo de ICSI en el contexto de factores de infertilidad de origen no masculino.

#### Referencias

1. Van Steirteghem A. What next for assisted reproductive technology? A plea for an evidence-based approach. *Hum Reprod* 2008; 23(12): 2615-2616.
2. Harper J, Jackson E, Sermon K et al. Adjuncts in the IVF laboratory: where is the evidence for 'add on' interventions? *Hum Reprod* 2017; 32(3): 485-491.
3. Dyer S, Chambers GM, de Mouzon J et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: Assisted Reproductive Technology 2008, 2009 and 2010. *Hum Reprod* 2016; 31(7): 1588-1609.
4. Evers JLH. Santa Claus in the fertility clinic. *Hum Reprod* 2016; 31(7): 1381-1382.
5. Devroey P. Interview. *Focus in Reproduction* 2013: 19.
6. Davies MJ, Moore VM, Willson KJ et al. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N Engl J Med*. 2012; 366: 1803-1813.
7. Bhattacharya S, Hamilton MPR, Shaaban M et al. Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2001;357:2075-2079.
8. Grimstad FW, Nangia AK, Luke B et al. Use of ICSI in IVF cycles in women with tubal ligation does not improve pregnancy or live birth rates. *Hum Reprod* 2016; 31(12): 2750-2755.
9. Luna M, Bigelow C, Duke M et al. Should ICSI be recommended routinely in patients with four or fewer oocytes retrieved? *J Assist Reprod Genet*. 2011; 28: 911-915.
10. Butts SF, Owen C, Mainigi M et al. Assisted hatching and intracytoplasmic sperm injection are not associated with improved outcomes in assisted reproduction cycles for diminished ovarian reserve: an analysis of cycles in the United States from 2004 to 2011. *Fertil Steril* 2014; 102(4): 1041-1047.
11. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology. *Fertil Steril* 2012; 98(6): 1395-1399.