



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Obstetricia y Ginecología

**COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE
MICROSCOPIA DE CONTRASTE PARA LA
SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES
DESTINADOS AL PROCESO DE
MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA CON
ÓVULOS DE DONANTE**

CRISTINA URDA MUÑOZ

TESIS DOCTORAL

Madrid 2015



**COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE
MICROSCOPIA DE CONTRASTE PARA LA
SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES
DESTINADOS AL PROCESO DE
MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA CON
ÓVULOS DE DONANTE**

Tesis Doctoral presentada por la licenciada

Cristina Urda Muñoz

Para optar al grado de **DOCTOR**

Directores:

Dr. Vicente Badajoz Liébana

Coordinador del Laboratorio Fecundación *In Vitro*

GINEFIV, S.L.

Dr. José Manuel Bajo Arenas

Catedrático de Ginecología y Obstetricia, UAM

Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario

Santa Cristina

Madrid 2015



Vicente Badajoz Liébana, Licenciado en Biología, Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, y Coordinador del Laboratorio de Fecundación *In Vitro* de Ginefiv y **Prof. D. José Manuel Bajo Arenas**, Catedrático de Ginecología y Obstetricia de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario Santa Cristina.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “**COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE MICROSCOPIA DE CONTRASTE PARA LA SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DESTINADOS AL PROCESO DE MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA CON ÓVULOS DE DONANTE**” ha sido realizado por Dña. Cristina Urda Muñoz bajo su dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis para alcanzar el grado de Doctor ante el Tribunal correspondiente en la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 6 de Mayo de 2015

Dr. Vicente Badajoz Liébana

Prof. D. José Manuel Bajo Arenas

A mis **padres**, por enseñarme que un esfuerzo merece la pena.

A Antonio.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. JOSÉ MANUEL BAJO ARENAS**, por sus consejos y su constante motivación para la realización de esta tesis. Gracias por estar disponible cuando le he necesitado.

Al **Dr. VICENTE BADAJOZ LIÉBANA** por su dedicación y el tiempo invertido para que esta tesis fuera adelante. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de continuar en el fantástico mundo de la reproducción asistida.

A todo el equipo **Ginefiv**, por la dedicación continua para conseguir una nueva vida. Gracias por la profesionalidad exquisita y por no borrar la sonrisa día tras día.

A todos mis compañeros del **Laboratorio de Embriología y Andrología**, nada de esto sería posible sin vosotros. Gracias por desarrollar esa actividad constante, por haberme enseñado tantas cosas, y por ser una gran familia. Y gracias por haberme ofrecido vuestra ayuda cuando la he necesitado.

A mi colega **Teresa Sánchez Arenas**, por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A la **Dra. Laura Melado Vidales**, por dedicarme su tiempo.

A **Berta Rodríguez Frutos** y a **Laura del Puerto Nevado**, mis grandes amigas. Gracias por transmitirme tanta energía, por toda la ayuda, por todos los consejos, por estar siempre disponibles, en definitiva, gracias por quererme tanto.

A todos mis **compañeros de la Universidad**, porque en muchas ocasiones me ayudaron a entender la Biología. Gracias a todos, a Bernardo Nuche Berenguer, a Jesús Tomas Sánchez Costa, a Alicia Gonzalo Gómez, etc. Gracias por esos maravillosos días entre aulas, prácticas, biblioteca, y cafetería. Y gracias por continuar todavía a mi lado.

A mi **hermano**, Jesús Urda, por ser un referente en mi vida. Gracias por estar cuando más te necesito y por alegrarme la vida con tu presencia e historias.

A **Antonio Cervantes Casares**, mi compañero de viaje. Gracias por quererme tanto y tan bien. Nunca lo hubiese conseguido sin ti.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1. EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS.....	35
2. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	38
3. SELECCIÓN DE DONANTES DE ÓVULOS.....	38
4. RECEPTORAS DE ÓVULOS.....	39
5. PREPARACIÓN Y SINCRONIZACIÓN DEL CICLO ENTRE DONANTE Y RECEPTORA.....	41
6. ESTUDIO BÁSICO DE LA INFERTILIDAD MASCULINA: SEMINOGRAMA.....	42
6.1 Movilidad espermática.....	44
6.2 Morfología espermática.....	44
6.3 Diagnóstico de las muestras seminales.....	45
7. ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN ESPERMÁTICA.....	46
8. SELECCIÓN DE DONANTES DE SEMEN.....	49
9. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS PARA LA MICROINYECCIÓN.....	51
9.1 Capacitación seminal.....	51
9.2 Criopreservación seminal.....	52
10. RECUPERACIÓN DE LOS ÓVULOS MEDIANTE PUNCIÓN TRANSVAGINAL.....	53
11. SELECCIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES.....	54
11.1. Grupo IMSI.....	54
11.2. Grupo ICSI.....	56
12. REALIZACIÓN DE LA MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA.....	56

13. VALORACIÓN DE LA FECUNDACIÓN Y CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA....	57
14. TRANSFERENCIA EMBRIONARIA.	59
15. DETECCIÓN DEL EMBARAZO.	60
16. ORGANIZACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	60
17. ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	62
RESULTADOS	65
1. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS LLEVADOS A ESTUDIO.	67
2. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TÉCNICAS: IMSI E ICSI	68
3. GRUPO DE MUESTRAS EN FRESCO: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE IMSI E ICSI.....	73
3.1. Subgrupo de muestras en fresco teratozoospermicas: estudio comparativo entre IMSI e ICSI	74
3.2. Subgrupo de muestras en fresco con factor masculino severo (OAT): estudio comparativo entre IMSI e ICSI	74
3.3. Subgrupo de muestras en fresco con un perfil de la fragmentación del ADN espermático: estudio comparativo entre IMSI e ICSI	75
4. GRUPO DE MUESTRAS CONGELADAS: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE IMSI E ICSI	80
4.1. Subgrupo de muestras congeladas teratozoospermicas: estudio comparativo entre IMSI e ICSI.	81
4.2. Subgrupo de muestras congeladas con factor masculino severo (OAT): estudio comparativo entre IMSI e ICSI.....	81
4.3. Subgrupo de muestras congeladas con un perfil de fragmentación del ADN espermático: estudio comparativo entre IMSI e ICSI	82
5. MUESTRAS DE SEMEN DE DONANTE: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE IMSI E ICSI	87
DISCUSIÓN.....	89
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFÍA.....	123
ANEXO.....	133

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Relación de abreviaturas que aparecen en texto. En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

A: astenozoospermicas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ASEBIR: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

AT: astenoteratozoospermicas

CCCO: complejos cúmulo-corona-ovocito

CFTR: gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (del inglés *cystic fibrosis transmembrane regulator*)

CO₂: dióxido de carbono

CP: corpúsculo polar

DGP: diagnóstico genético preimplantacional

FISH: hibridación in situ de fluorescencia (del inglés *fluorescence in situ hybridization*)

FIV: fecundación *in vitro*

FSHr: hormona folículo estimulante

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina (del inglés *gonadotropin releasing hormone*)

HBV: virus de la hepatitis B (del inglés *hepatitis B virus*)

HCV: virus de la hepatitis C (del inglés *hepatitis C virus*)

HIV: virus de inmunodeficiencia humano (del inglés *human immunodeficiency virus*)

IA: inseminación artificial

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides o microinyección espermática (del inglés *intracytoplasmic sperm injection*)

IF: índice de fragmentación

IMSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente (del inglés *intracytoplasmic morphologically select sperm injection*).

IVE: interrupción voluntaria del embarazo

LCF: latido cardíaco fetal

mg: miligramo

MI: metafase I

MII: metafase II

ml: mililitro

mm: milímetro

millones/mil: millones por mililitro

MSOME: evaluación de la morfología de los orgánulos de espermatozoides móviles (del inglés *motile sperm organelar morphology examination*)

n: número

N: normozoospermicas

N₂: nitrógeno

nm: nanómetros

Nº: número

OA: oligoastenozoospermicas

OAT: oligoastenoteratozoospermicas

°C: grados centígrados

OMS: Organización Mundial de la Salud

p: p-valor o nivel de significación

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*)

pH: "*pondus Hydrogenium*"

P-I: profase-I o vesícula germinal

PICSI: ICSI fisiológica

PN : pronúcleos

PVP: polyvinylpyrrolidona

RH: factor Rhesus

rpm: revoluciones por minuto

SCD: test de la dispersión de la cromatina (del inglés *sperm chromatin dispersion test*)

SCSA: test de la dispersión de la cromatina (del inglés *sperm chromatin structure assay*)

SEF: Sociedad Española de Reproducción

SG: saco gestacional.

SPSS: del inglés *statistical package for the social sciences*

T: teratozoospermias

TRA: técnicas de reproducción asistida.

TUNEL: del inglés *TdT-mediated x-dUTP nick end labeling*

UI: Unidades internacionales

βHCG: subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana

χ²: xi cuadrado

μl: microlitro

μm: micrómetro

RESUMEN

Introducción

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides o microinyección espermática (ICSI) se ha convertido en una de las técnicas de reproducción asistida (TRA) de referencia para los laboratorios de embriología. La selección morfológica de los espermatozoides se ha establecido como el mejor criterio para llevar a cabo el proceso de microinyección espermática, y se han reportado bajas tasas de fecundación, implantación, y disminución de la probabilidad de embarazo tras ICSI cuando la morfología espermática presentaba anomalías severas, independientemente de la procedencia de los espermatozoides.

En el año 2002 se desarrolló un nuevo método denominado evaluación de la morfología de los orgánulos de espermatozoides móviles o MSOME (del inglés *motile sperm organelar morphology examination*), que permite visualizar a tiempo real, y sin necesidad de tinción, la morfología espermática de forma más precisa. El MSOME se consiguió acoplando una óptica de contraste de interferencia diferencial de Nomarski a un microscopio invertido. De la unión del MSOME y la ya conocida ICSI surgió la denominada inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente o IMSI (del inglés *intracytoplasmic morphologically select sperm injection*).

En la actualidad, los microscopios invertidos donde se realiza la selección espermática están acoplados a la óptica de contraste por modulación de Hoffman. Según algunos autores, la principal desventaja a la que se enfrenta este sistema de microscopía es el bajo poder de resolución, ofreciendo un máximo de 400 aumentos para valorar ciertas características morfológicas del espermatozoide. Sin embargo, utilizar un microscopio invertido con contraste de interferencia diferencial de Nomarski, usando objetivos de 60x o 100x, parece ser la forma más adecuada para llevar a cabo este tipo de evaluaciones, ya que se pueden conseguir como mínimo entre 900 y 1500

aumentos. Sin embargo, el alto coste y el tiempo requerido para llevar a cabo el proceso de la selección espermática, son algunas de las desventajas a las que se enfrenta el sistema óptico de contraste de interferencia diferencial de Nomarski, si lo comparamos con la óptica de contraste por modulación de Hoffman.

Numerosos estudios clínicos han analizado el impacto de la IMSI en los resultados de un ciclo de microinyección espermática, valorando las tasas de fecundación e implantación, las calidades embrionarias, el embarazo clínico, el aborto y finalmente, el embarazo a término. Los primeros estudios con la técnica IMSI mostraron beneficios dentro de la población estudiada. Sin embargo, en la actualidad, encontramos resultados contradictorios, y controversia en las indicaciones de la técnica.

No obstante, no encontramos referencias de ningún estudio a día de hoy que haya valorado la selección espermática mediante la óptica de contraste de interferencia diferencial de Nomarski para realizar una IMSI dentro de un programa de donación de óvulos. Además, en todos los trabajos realizados se han descartado el uso de muestras congeladas.

Por todo ello, creemos que sería una buena oportunidad evaluar los resultados de los ciclos de ovodonación que se han realizado en nuestro centro con las dos ópticas de contraste con las que trabajamos de manera habitual para realizar la microinyección espermática: el contraste por modulación de Hoffman y el contraste de interferencia diferencial de Nomarski. Los resultados se valorarían tanto con muestras homólogas, como con muestras heterólogas, procedentes de eyaculados en fresco, o congelados.

Hipótesis:

Se ha postulado que una buena selección morfológica de los espermatozoides está relacionada con los resultados de un ciclo de microinyección espermática, por lo

tanto puede ser que el empleo de una técnica de microscopía frente a otra, para la selección de espermatozoides destinados al proceso de microinyección, tenga efectos significativos en los resultados finales de un ciclo. Además, se ha descrito como la microscopía de contraste de interferencia diferencial de Nomarski al tratarse de una óptica más potente que la microscopía de contraste por modulación de Hoffman, optimiza la selección de espermatozoides de mejor pronóstico. El empleo de esta técnica ha mostrado beneficios en las tasas de implantación, la gestación clínica, el aborto y el embarazo a término. Sin embargo, quedan por definir perfiles de pacientes que pudiesen beneficiarse de esta óptica más que otros. Los resultados podrían redundar en la determinación de qué método de microinyección es el más óptimo para cada pareja, así como evitar el uso de recursos adicionales, tanto para los pacientes, como para el centro de reproducción asistida.

Objetivos:

Mediante un estudio prospectivo no randomizado y utilizando un programa de donación de óvulos a pacientes receptoras, pretendemos:

1. Comparar los resultados clínicos obtenidos dependiendo del tipo de microscopía de contraste empleada para la selección de espermatozoides destinados a realizar la microinyección espermática. A su vez, realizar una comparación de los resultados clínicos en distintos grupos y/o subgrupos de pacientes, dependiendo del tipo de muestra espermática usada para el proceso de microinyección.
2. Definir qué tipo de pacientes pueden beneficiarse de la selección de espermatozoides con la microscopía de contraste por interferencia diferencial de Nomarski.

Materiales y métodos

Se seleccionaron de forma prospectiva y no randomizada todos los ciclos de ovodonación realizados en GINEFIV, durante el periodo comprendido entre Enero del 2009 y Septiembre del 2011. El resultado de dicha selección fue de 1499 pacientes. Entre todos ellos, el proceso de la microinyección espermática se realizó por la técnica IMSI en 934 pacientes, mientras que la técnica ICSI se realizó en 565 pacientes.

La estimulación ovárica de las donantes se realizó mediante un ciclo corto con antagonistas de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y un anticonceptivo previo durante al menos 14 días. La medicación utilizada fue FSHr (Gonal, Serono; Puregón, MSD) a dosis moderadas, entre 100UI-225UI. La punción ovárica se programó con la visualización de al menos 3 folículos superiores a 17mm, administrando un bolo de análogos de GnRH (Decapeptyl 0.2 mg) 36 horas previas. La preparación endometrial de las pacientes receptoras se realizó mediante ciclo sustitutivo administrando estrógenos: Progynova (BAYER) o Meriestra (NOVARTIS) por vía oral a dosis entre 4-8mg/día o bien Estradem Matrix (NOVARTIS) por vía transdérmica a dosis de 50-150mg/3 días, y si fue necesario se les realizó una supresión hipofisaria previa mediante anticonceptivos orales en pauta continua, o análogos de la hormona liberadora de gonadotropina, en la fase lútea del ciclo previo. El día de la punción ovárica de la donante, la receptora comenzó con una suplementación de gestágenos en forma de progesterona natural micronizada, Progeffik (EFFIK) o Utrogestán (SEID), por vía oral o vaginal. Confirmada la gestación, la administración de estrógenos y progesterona se mantuvo hasta un máximo de 100 días (8^a-12^a semana de gestación).

Todas las muestras seminales fueron obtenidas por masturbación. De la prueba del seminograma se recogieron los datos de volumen, concentración, movilidad tipo A + B (espermatozoides progresivos), y morfología. El diagnóstico de

las muestras se hizo siguiendo los valores de referencia establecidos por el manual de la OMS de 1999. La morfología espermática se valoró siguiendo las recomendaciones de la OMS de 1992, el cual establece que al menos el 30% de los espermatozoides tienen que ser morfológicamente normales. Se consideró un espermatozoide morfológicamente normal cuando el tamaño y forma de la cabeza, las características del cuello, y de la pieza intermedia, y la cola se establecieron dentro los valores de referencia marcados.

Para la determinación de la fragmentación del ADN espermático se siguió el protocolo del kit Halosperm®. Se obtuvo el índice de fragmentación (IF) de la muestra en 213 pacientes. La capacitación de la muestras se hizo mediante columnas de gradientes con una proporción 8:2 de Sperm Grad™ VITROLIFE y IVF™ VITROLIFE. Para la criopreservación de las muestras se utilizó Sperm Freeze™ Ferti Pro, en una proporción 10:7. En el proceso de descongelación, el crioprotector fue retirado mediante centrifugación y posterior lavado en IVF™.

Los cúmulos obtenidos en la punción transvaginal se mantuvieron hasta el proceso de decumulación en medio de cultivo G-IVF™ PLUS VITROLIFE cubierto con aceite de parafina filtrado (OVOIL™, VITROLIFE). Previamente a la ICSI, se realizó la decumulación de los cúmulos usando hialuronidasa (HYASE™-10X VITROLIFE) y medio tamponado (G-MOPS™ PLUS VITROLIFE) en una relación 1:9. Los óvulos en estadio de Metafase II fueron destinados al proceso de microinyección.

La selección espermática para el proceso de microinyección se hizo en el grupo IMSI a temperatura ambiente y con el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti acoplado a la microscopía de contraste interferencia diferencial de Nomarski. Los espermatozoides fueron seleccionados a 900 aumentos siguiendo los criterios de Bartoov 2002. Se descartaron de la selección aquellos espermatozoides que presentaron más anomalías morfológicas, y en particular, mayor porcentaje de

Resumen

vacuolas en el área de la cabeza espermática. La selección de espermatozoides en el grupo ICSI se hizo en un microscopio Nikon Eclipse TE2000S con superficie calefactada a 37°C. Se utilizó un objetivo de 40x, consiguiendo 400 aumentos, y los espermatozoides fueron seleccionados por su morfología según los parámetros marcados por la OMS.

El proceso de microinyección se realizó con la ayuda de micropipetas Humagen, a 37°C y en los mismos microscopios invertidos donde se había realizado la selección de los espermatozoides. Los óvulos microinyectados se cultivaron de forma individualizada en microgotas de G-1™ v5 PLUs VITROLIF, y se mantuvieron en cultivo en las estufas incubadoras.

En la evaluación de la fecundación, a las 18-20 horas post inseminación, solo se consideró fecundación correcta cuando se visualizaron 2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares (2PN y 2CP). La división de los cigotos se evaluó siguiendo las pautas de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). Los embriones con 2 ó 4 blastómeros en día +2 de desarrollo que evolucionaron a 7 y 9 células entre las 67-72 horas post inseminación, fueron considerados de calidad A y B. En el estudio se recogió el porcentaje de embriones de calidad A+B en día 3 de desarrollo, día en el que se realizó la transferencia intrauterina ecoguiada.

A los 14 días post transferencia embrionaria, la detección en sangre de la gonadotropina coriónica humana (β HCG) mostró la presencia de embarazo bioquímico. Las pacientes fueron citadas para controles ecográficos y se recogió la presencia de saco gestacional (SG) y latido cardíaco fetal (LCF). Posteriormente, se mantuvo un registro de las gestaciones clínicas que llegaron a término.

Dentro del estudio, 934 pacientes formaron el grupo de pacientes IMSI y 565 el grupo de pacientes ICSI. Posteriormente, se establecieron tres grupos por procedencia

de muestra: el grupo de muestras en fresco (n=376), el grupo de muestras congeladas (n=802), y el grupo de muestras de semen de donante (n=321).

Además, en las muestras de origen homólogo se tuvo en cuenta el diagnóstico de la teratozoospermia, la oligoastenoteratozoospermia (OAT), y el IF para establecer subgrupos de estudio.

El estudio estadístico se llevó a cabo usando el SPSS para Windows Versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). La comparación de las distintas variables continuas entre grupos y/o subgrupos se hizo mediante un contraste de medias utilizando el test T de Student. El análisis de las variables discretas se realizó mediante comparación de proporciones o χ^2 de Pearson o el test exacto de Fisher. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

Todos los resultados fueron calculados por transferencia realizada y siguiendo la recomendación de Zegers-Hochschild y colaboradores 2009.

Resultados

En el estudio comparativo dentro de la población de estudio se observaron diferencias significativas en la procedencia de las muestras estudiadas, y en el IF entre los dos grupos. Sin embargo, ni las características basales del semen homólogo, ni el IF superior al 30% mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio. También hubo diferencias significativas en el porcentaje de embriones de calidad A+B a favor de la técnica ICSI. No se encontraron diferencias significativas en las tasas de fecundación e implantación, ni en la gestación clínica, el aborto o el embarazo a término.

Con lo cual, el embarazo a término, y el hecho de tener un niño nacido en casa no mostró diferencias entre grupos, independientemente de que se realizase IMSI o ICSI. Consideramos que en esta población general de estudio, la óptica usada de

forma habitual en los laboratorios de reproducción asistida, como es la de contraste por modulación de Hoffman para realizar ICSI, sigue siendo apta para seleccionar espermatozoides de buen pronóstico.

En el estudio comparativo dentro de las muestras en fresco, correspondiente a todos los pacientes que recogieron la muestra espermática el día de la punción, tampoco se encontraron beneficios de la técnica IMSI en términos de tasas de fecundación e implantación, y gestación clínica, aborto y embarazo a término, independientemente de la calidad seminal o del tipo de la muestra utilizada para la microinyección espermática. Con lo cual, no podemos asegurar que un tipo de microscopía más resolutiva sea fundamental para aumentar el número de niños nacidos en este perfil de pacientes.

En el estudio comparativo dentro del grupo de muestras congeladas no podemos reportar beneficios de la IMSI en cuanto a mejor método de selección, ya que los resultados en términos de tasas de fecundación e implantación, y gestación clínica, aborto y embarazo a término fueron equiparables. Con lo cual, reportamos que la selección de espermatozoides en el grupo ICSI no tuvo mayores implicaciones en los resultados finales del ciclo.

Sin embargo, para ciertos pacientes de esta población, la ICSI sí pudo tener ciertas repercusiones. En nuestro estudio estadístico encontramos diferencias significativas que posicionan a la IMSI como el mejor método cuando trabajamos con muestras congeladas OAT. Ante parámetros seminales y condiciones del ciclo similares, la tasa de implantación (IMSI: 26.37 ± 36.00 ; ICSI: 14.40 ± 29.43), la gestación clínica (IMSI: 38.5%; ICSI: 15.3%) y el embarazo a término (IMSI: 33%; ICSI: 13.6%), mostraron diferencias significativas a favor de la IMSI. Sin embargo, no encontramos beneficios ni en las calidades embrionarias, ni en el porcentaje de aborto.

Por otro lado, en el subgrupo de muestras congeladas de pacientes con un perfil de fragmentación del ADN espermático, se obtuvieron beneficios de la técnica IMSI en cuanto a la tasa de implantación (IMSI: 33.3 ± 32.91 ; ICSI: 8.3 ± 24.64), la gestación clínica (IMSI: 57.1%, ICSI: 10%) y el embarazo a término (IMSI: 23.8%; ICSI: 6.7%). Sin embargo, la probabilidad de aborto se mostró significativamente más alta en el grupo de IMSI (IMSI: 33.3%; ICSI: 5%).

En el estudio comparativo dentro del grupo de muestras de semen de donante la selección de espermatozoides de buen pronóstico no estuvo comprometida por el empleo de la técnica ICSI. Los resultados finales del ciclo se mostraron equiparables entre ambas técnicas.

Conclusiones:

En un programa de donación de óvulos a pacientes receptoras con diferentes tipos de muestras seminales observamos:

1. La microscopía de contraste por modulación de Hoffman sigue siendo un sistema válido para la selección de espermatozoides, excepto cuando nos encontramos con muestras seminales de baja fertilidad que han sido previamente criopreservadas.
2. La microinyección espermática con el sistema de microscopía de contraste por interferencia diferencial de Nomarski aumenta la eficacia de la tecnología de la reproducción en una población de pacientes con muestras criopreservadas: pacientes diagnosticados con oligoastenoteratozoospermia (OAT), y pacientes con diferentes índices de fragmentación (IF) en el ADN espermático.

INTRODUCCIÓN

Según la organización mundial de la salud (OMS), la esterilidad es la incapacidad que tiene una pareja en edad reproductiva para lograr una gestación tras un año de relaciones sexuales, con una frecuencia normal, y sin ningún uso de método anticonceptivo. Según los últimos estudios epidemiológicos, la esterilidad afecta al 15% de la población en edad reproductiva [1]. Con el objetivo de reducir los problemas de esterilidad, en la actualidad contamos con un abanico de técnicas de reproducción asistida (TRA), que suponen para muchas parejas la única opción para tener un niño nacido en casa. Entendemos por TRA al conjunto de métodos biomédicos que ayudaran a facilitar o substituir a los procesos biológicos naturales que se desarrollan durante la procreación humana [2].

Cuando ambos gametos, espermatozoide y óvulo, proceden de la pareja que se somete a la técnica hablamos de TRA homólogas. Pero, las alteraciones que hacen que la probabilidad de gestación espontánea disminuya, pueden afectar a la producción de gametos masculinos y femeninos, hablando entonces de técnica heteróloga, que es aquella en la que uno de los gametos o ambos proceden de donantes ajenos a la pareja [2].

La probabilidad de la gestación espontánea también puede deberse a la incapacidad de los gametos para interactuar y formar un embrión. En este caso recurriremos a realizar una inseminación artificial (IA), una fecundación *in vitro* convencional (FIV convencional) o una inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). La IA consiste en depositar la muestra de semen en la cavidad uterina de la paciente, e implica la necesidad de sincronizar la inseminación con la ovulación, bien en un ciclo natural o con estimulación ovárica [3-5].

Cuando se realiza una estimulación ovárica para recuperar los óvulos mediante la aspiración transvaginal, la unión de gametos es extracorpórea y recurrimos a la FIV convencional o a la inyección intracitoplasmática de espermatozoides o ICSI (del

Introducción

inglés *intracytoplasmic sperm injection*) [2, 6, 7]. La FIV convencional consiste en poner los óvulos en contacto con la muestra seminal previamente procesada en el laboratorio. El proceso biológico de la fecundación ha de realizarse en incubación bajo unas condiciones de cultivo y ambientales determinadas [5]. La ICSI consiste en la unión del óvulo y el espermatozoide mediante técnicas de micromanipulación [8].

La técnica ICSI se ha convertido en la técnica de referencia de los laboratorios de reproducción asistida. Según el registro nacional de la Sociedad Española de Reproducción (SEF), en el 89,8% de los ciclos iniciados en el 2012, la ICSI fue la técnica más usada para llevar a cabo la fecundación. La técnica en sí consiste en introducir un espermatozoide, previamente inmovilizado y aspirado con una micropipeta dentro de un óvulo libre de células de la granulosa. De esta manera, se consigue la unión de los dos gametos, eliminando así los primeros pasos del proceso biológico de la fecundación [8, 9].

El desarrollo de la ICSI surgió en la década de los 80, gracias al desarrollo de numerosos métodos de micromanipulación en la industria pecuaria para conseguir la unión de gametos. El primer nacimiento tras ICSI se documentó en conejos [10], siendo la técnica posteriormente aplicada en bovinos [11]. Pero, el primer nacimiento tras ICSI en humanos no llegaría hasta el año 1992 [8].

En un principio, la ICSI se indicó para pacientes con fallos de FIV convencional o cuando la concentración espermática era tan baja que la FIV convencional no podía llevarse a cabo. Pero tras haberse probado como un método efectivo para mejorar las probabilidades de embarazo se convirtió en una técnica de rutina para los laboratorios de embriología [9].

Sin embargo, y a pesar de que la introducción de la técnica de la ICSI es un hito en el desarrollo de las TRA, también se enfrenta a críticas y a problemas aún sin resolver. Por un lado, el hecho de facilitar la interacción entre el óvulo y el

espermatozoide hace que eliminemos de la barrera fisiológica anomalías espermáticas, como podrían ser una baja movilidad y concentración, o una mala morfología espermática [12]. Este tipo de alteraciones en los parámetros seminales, se han relacionado con una disminución en el número de nacidos vivos, así como con la probabilidad de tener descendencia con anomalías cromosómicas o alteraciones fenotípicas [13, 14].

Por otro lado, se ha cuestionado el poder de resolución del sistema óptico utilizado para realizar la inyección intracitoplasmática o microinyección espermática [15, 16]. La introducción de la óptica de contraste por modulación de Hoffman incrementó la resolución de las imágenes hasta 400 aumentos para poder visualizar de manera más pulida tanto las características del óvulo, como las del espermatozoide [17]. Sin embargo, el espermatozoide es una célula muy pequeña y se ha documentado que ciertas características del gameto masculino no pueden apreciarse con este tipo de microscopía, siendo para algunos autores unas de las principales limitaciones de la técnica ICSI [15, 16, 18].

En la literatura se han barajado diferentes parámetros seminales para predecir los resultados de un ciclo de FIV-ICSI. Dentro de los más estudiados tradicionalmente, la movilidad, concentración y la morfología espermática se han establecido como estándares clave en el estudio de la fertilidad masculina [19-21].

Pero, la selección morfológica de los espermatozoides se ha establecido como el mejor criterio para llevar a cabo el proceso de microinyección espermática [15, 22, 23].

También, se ha llegado a plantear que los resultados de ICSI son independientes de los parámetros seminales, y se han mostrado igualdad de resultados, independientemente de la calidad de la muestra usada para la microinyección [24-26]. Algunos autores entienden que cuando se trata de un ciclo de

ICSI, las barreras fisiológicas son eliminadas y la selección espermática depende del embriólogo, el cual debe excluir del proceso a los espermatozoides anormales [27]. Aunque, también se ha postulado que solo la vitalidad espermática es importante para poder fecundar el óvulo [25], es decir la sola presencia de espermatozoides vivos es el único requerimiento para conseguir la fecundación tras ICSI. En estos estudios la morfología del espermatozoide no se ha establecido como un factor crítico, ya que se ha postulado que se puede conseguir fecundación con espermatozoides que de forma natural no podrían, sin acrosoma, inmóviles pero vivos o morfológicamente anormales [24, 28] .

Sin embargo, otros autores admiten que una correcta selección espermática mejora los resultados [22, 29], y se han reportado bajas tasas de fecundación, implantación, y disminución de la probabilidad de embarazo tras ICSI cuando la morfología espermática presenta anomalías severas [23, 30, 31].

Los primeros estudios basados en los resultados de IA y FIV convencional sí muestran una sensibilidad de los parámetros seminales como un factor pronóstico. La concentración y la movilidad de la muestra se han relacionado con los embarazos a término después de realizar ciclos de IA [16]. Un buen movimiento rectilíneo se relaciona con una correcta morfología acrosomal, que a su vez nos indica que una morfología normal es necesaria para que el espermatozoide sea capaz de atravesar las barreras del tracto femenino y de llevar a cabo la reacción acrosómica con la zona pelúcida del óvulo [15]. La morfología de la cabeza del espermatozoide se ha relacionado con el aumento de embarazos en ciclos de FIV convencional e ICSI [16], así como con el potencial fertilizador de la muestra [32, 33].

Se ha remarcado que tanto la valoración morfológica del espermatozoide por parte del andrólogo, como la selección de espermatozoides por parte del embriólogo para realizar una ICSI, impide la detección de ciertas malformaciones del

espermatozoide que tendrían consecuencias en los resultados finales de un ciclo [34, 35]. Dicha apreciación fue postulada gracias al desarrollo de un método que permite visualizar la morfología espermática de forma más precisa. El método fue denominado evaluación de la morfología de los orgánulos de espermatozoides móviles o MSOME (del inglés *motile sperm organelar morphology examination*) [15].

Se han desarrollado diferentes técnicas para poder estudiar las características del gameto masculino, y así relacionarlos con los resultados de un ciclo de FIV-ICSI: las características morfológicas del espermatozoide se han documentado mediante estudios de microscopía electrónica de transmisión y barrido [16, 32], el equilibrio cromosómico se analiza mediante la hibridación in situ de espermatozoides o FISH (del inglés *fluorescence in situ hybridization*) [36, 37], y la integridad nuclear mediante técnicas como TUNEL (del inglés *TdT-mediated x-dUTP nick end labeling*) [38] o el test de la dispersión de la cromatina o SCSA (del inglés *Sperm Chromatin Structure Assay*) [39]. Sin embargo, ninguna de ellas puede llevarse a cabo en el momento de la microinyección.

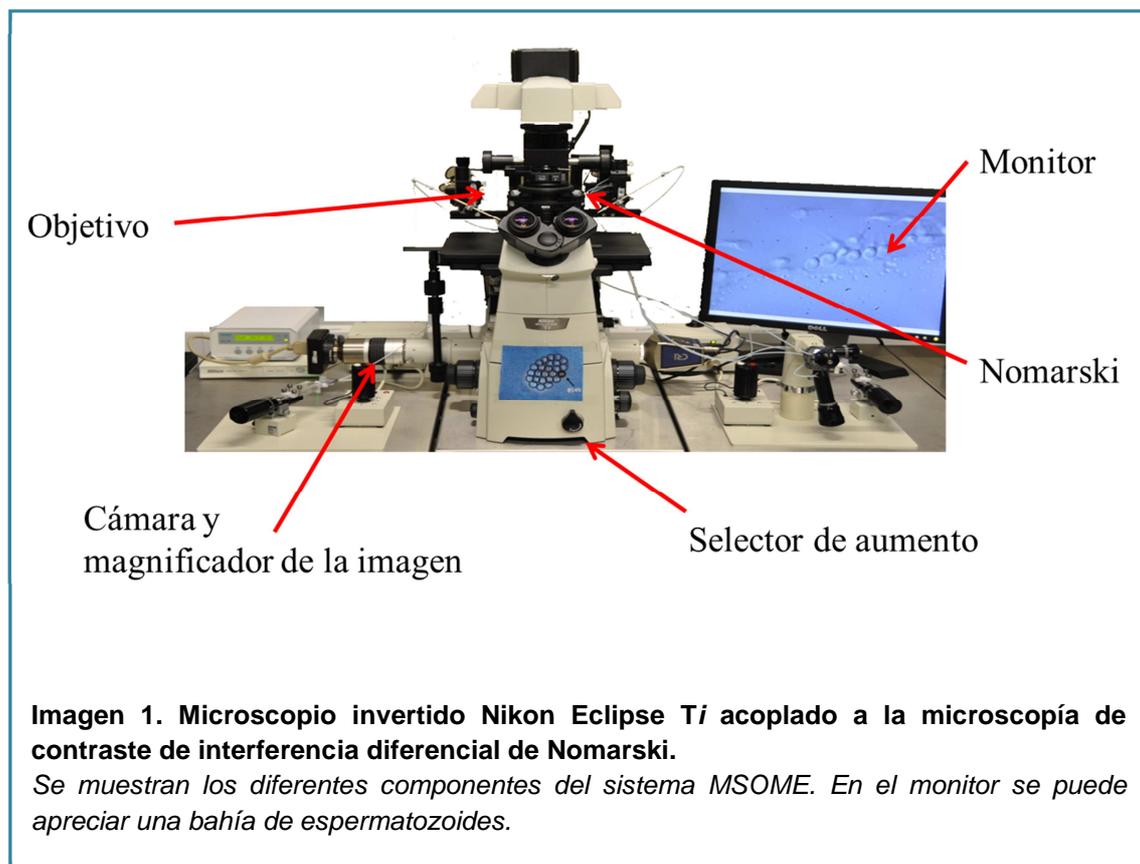
Con lo cual, se han intentado desarrollar e introducir diferentes técnicas no invasivas con el objetivo de no seleccionar espermatozoides de mal pronóstico. Por ejemplo, se ha descrito el uso de microscopios de luz polarizada para realizar la ICSI con el fin de poder visualizar la organización de las organelas de los espermatozoides, basándose en las propiedades birrefringentes de estas células [40], también se han desarrollado protocolos para la selección de células espermáticas maduras para realizar la microinyección, basándose en la selección de los espermatozoides que se unen a receptores del ácido hialurónico (ICSI fisiológica o PICS) [41].

Por otro lado, la alta resolución del sistema óptico para la selección de espermatozoides morfológicamente normales (MSOME) [15] ha sido la técnica más

Introducción

introducida en los laboratorios, y la que más polémica ha levantado en el mundo de la literatura científica [42].

Bartoov y colaboradores [15], intentando demostrar que los resultados de ICSI estaban relacionadas con la morfología del espermatozoide, desarrollaron el MSOME para visualizar la morfología espermática de forma individual, a 6600 aumentos, sin necesidad de tinción y a tiempo real.



El MSOME se consiguió acoplado en un microscopio invertido una óptica de contraste de interferencia diferencial de Nomarski. A su vez todo este sistema fue conectado a una cámara de alta definición con 380.000 píxeles capaz de capturar imágenes en color de alta calidad para el estudio morfológico. Para conseguir los aumentos, el sistema, se basó en cuatro parámetros principales: un objetivo de 100x,

un selector de aumento de 1.5x, un acoplador de magnificación en la cámara de 0.99x, y un magnificador de la imagen de 44.45x. Por lo tanto, los aumentos totales conseguidos fueron: $100 \times 1.5 \times 0.99 \times 44.5 = 6.600$ aumentos, (Imagen 1).

Los criterios para clasificar los orgánulos del espermatozoide habían sido previamente establecidos en estudios de microscopia electrónica [16, 32]. La morfología normal del núcleo quedó definida por la forma: textura lisa, simétrica y oval, y por el contenido de la cromatina: masa cromática homogénea y sin presencia de invaginaciones, intrusiones y con menos del 4% del área nuclear ocupado por vacuolas.

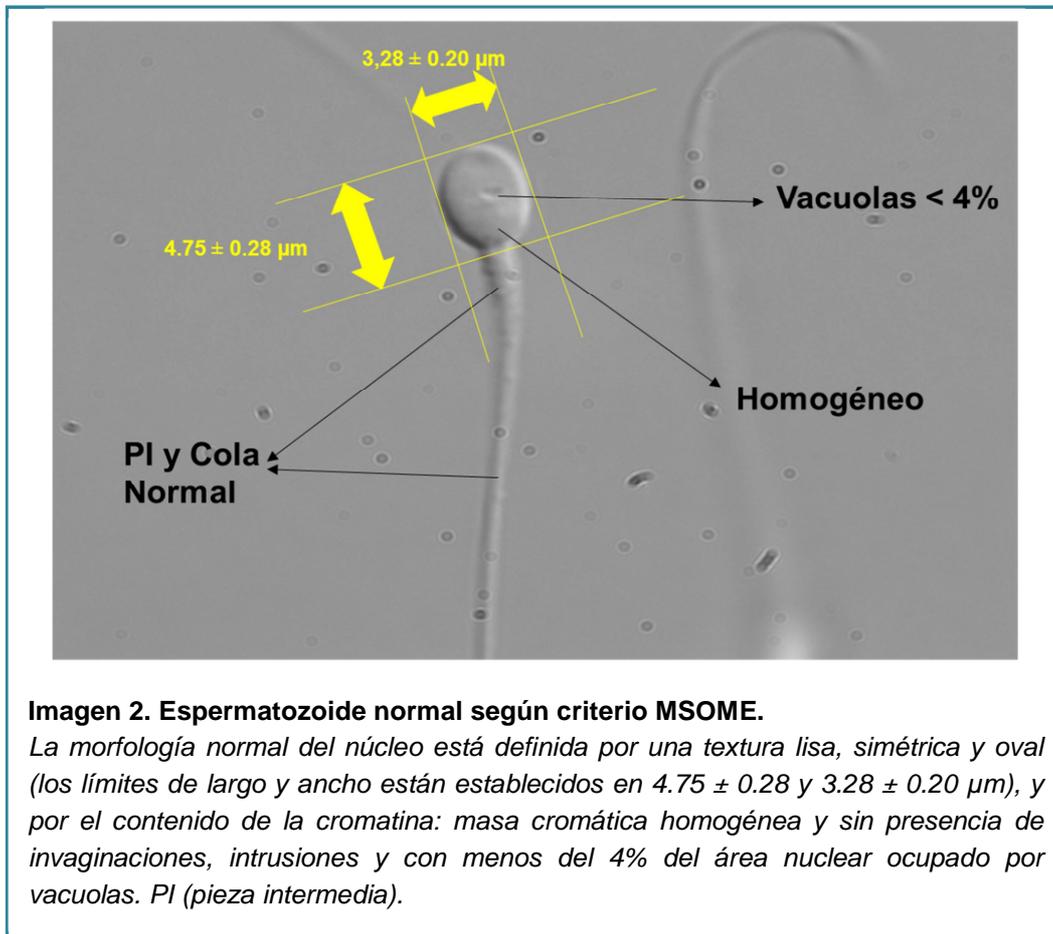
En función de estos parámetros los límites de largo y ancho están establecidos en 4.75 ± 0.28 y 3.28 ± 0.20 μm respectivamente. Refiriéndose al acrosoma y la lámina postacrosomal, se consideran anormales si se encuentran parcial o totalmente ausente o vesiculada, mientras que las mitocondrias no deben estar ausentes o desorganizadas. Finalmente, la presencia de gota citoplasmática en el cuello, al igual que una cola rota, corta o doble son considerados rasgos anormales (Imagen 2).

En el primer estudio donde se testó la fiabilidad del método MSOME se analizaron 100 muestras espermáticas [15], las cuales habían sido previamente utilizadas en ciclos de ICSI. Se analizaron 100 espermatozoides por muestra, descartándose a aquellos que a 400 aumentos no habrían sido seleccionados. Este análisis morfológico no mostró diferencias con las establecidas por la Organización Mundial de la Salud de 1999 [43], demostrándose posteriormente, si cabe, que el MSOME es un método más estricto a la hora de evaluar la morfología espermática [18].

Se estudiaron morfológicamente seis de los orgánulos celulares: acrosoma, lámina postacrosomal, cuello, mitocondrias, cola y núcleo. Todos ellos, según los criterios establecidos, tenían que entrar en los rasgos de normalidad para clasificar a

Introducción

un espermatozoide como morfológicamente normal. Los resultados mostraron que el núcleo, en término de forma y contenido, era el parámetro morfológico más influyente en las tasas de fecundación y en la probabilidad de embarazo.



Atendiendo a estos resultados se utilizó el MSOME como criterio para realizar una ICSI. De la unión del MSOME y la ya conocida ICSI surgió la denominada inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente o IMSI (del inglés *intracytoplasmic morphologically select sperm injection*). Los resultados en términos de posibilidad de embarazo y aborto fueron significativamente mejores en los pacientes donde se realizó IMSI. Las gestaciones clínicas aumentaron de un 30 a un 66% y se disminuyeron los abortos de un 33 a un 9% [34].

El mismo grupo de Bartoov postulo que la selección de espermatozoides con algún tipo de anomalía para realizar una IMSI tiene implicaciones en las tasas de fecundación e implantación, en las calidades embrionarias, en el porcentaje de aborto y en el embarazo a término. Aunque, sus resultados muestran que existen malformaciones en el espermatozoide, tales como una pequeña desviación en forma y tamaño, que pueden llegar a dar embarazo. Sin embargo, cuando se supera el umbral de vacuolas la probabilidad de aborto aumenta considerablemente [35].

Las vacuolas del espermatozoide se han descrito como concavidades que se extienden desde la membrana de la cabeza hasta el núcleo pasando a través del acrosoma. Desde la década de los años 50, y gracias a estudios de microscopía electrónica se conoce que las cabezas de los espermatozoides humanos pueden contener al menos una vacuola en su núcleo [44].

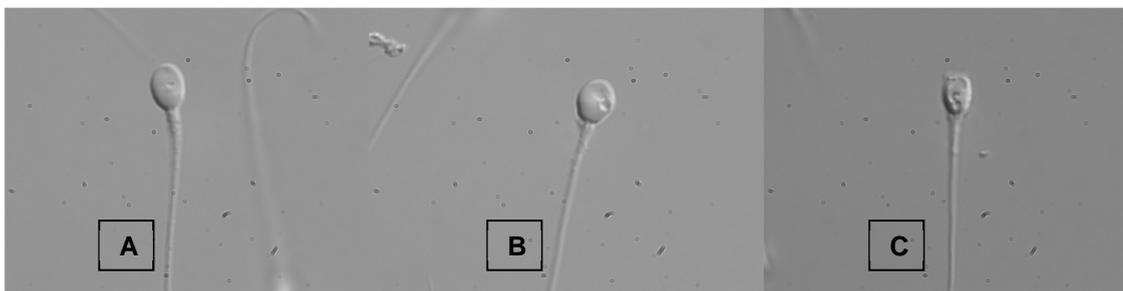


Imagen 3. Visualización de espermatozoides con la óptica de contraste diferencial de interferencia Nomarski.

A, espermatozoide con forma normal y una vacuola que ocupa menos del 4% del área nuclear. B, espermatozoide con forma normal y dos vacuolas pequeñas que ocupan más del 4% del área nuclear. C, espermatozoide con núcleo no homogéneo

El método MSOME se ha presentado como la mejor herramienta para visualizar a tiempo real este tipo de formaciones del núcleo espermático [30] (Imagen 3). Sin embargo, el origen de las vacuolas así como sus consecuencias clínicas, a día de hoy permanece en debate.

Por un lado, se sugiere que estas formaciones nucleares son de origen acrosómico y que su presencia podría estar correlacionada con el estado de madurez espermático, y en consecuencia con la capacitación y la reacción acrosómica [45, 46]. Durante la migración por el tracto genital femenino, o durante la incubación en medios de cultivos destinados a fecundación *in vitro*, el espermatozoide experimenta una serie de cambios bioquímicos y biofísicos, llamados en conjunto capacitación, que le preparan para llevar a cabo la reacción acrosómica. El espermatozoide “reaccionado” será en definitiva el espermatozoide capacitado para fecundar el óvulo [47]. La presencia y el tamaño de las vacuolas disminuyen durante la maduración espermática, por lo que se sugiere que espermatozoides con vacuolas grandes no deberían ser usados para la microinyección [44]. Sin embargo, las vacuolas pequeñas podrían ser una característica fisiológica de los espermatozoides [44, 45].

En cambio, otros autores [23, 30, 48, 49] tienden a apoyar la idea de que la presencia de vacuolas puede reflejar defectos moleculares responsables de las anomalías que se producen en el empaquetamiento de la cromatina del espermatozoide durante la maduración espermática, y por lo tanto ser el signo de un espermatozoide más vulnerable a sufrir daños en su ADN [50].

Hasta el momento, se ha descrito el número, tamaño, localización o frecuencia con la que se encuentran las vacuolas [23, 45], pero no se ha estandarizado una clasificación, y el tamaño ocasiona más debate aún si cabe [51]. En un principio, se estableció que una vacuola era grande cuando el total del área vacuolar ocupaba más del 4% del área nuclear [15]. Sin embargo, la definición más adquirida en la literatura ha sido la que se establece cuando más del 50% del área nuclear está vacuolada [44, 52, 53]. Aunque, otros autores marcan el punto de corte en el 13% del área nuclear para hablar de una vacuola grande [54], o incluso en el 25% [55].

La fragmentación del ADN es un parámetro objetivo y fácil de diagnosticar, haciéndolo responsable de los fallos de ICSI por factor masculino [39, 56]. Pero, la integridad del ADN no puede ser evaluado en el espermatozoide en el momento de la microinyección. Por eso, con la incorporación del MSOME se ha investigado la relación entre la presencia de vacuolas en el espermatozoide y la fragmentación del ADN espermático, así como la posible relación con el estatus cromosómico del espermatozoide.

Se ha documentado un incremento de la cromatina inmadura o descondensada, la cual es más vulnerable a sufrir daños, en espermatozoides con vacuolas grandes seleccionados con MSOME [48, 54, 55, 57, 58]. En cuanto a la fragmentación de ADN espermático, se han realizado estudios comparativos entre espermatozoides previamente seleccionados con MSOME con o sin vacuolas grandes. Hay estudios que muestran mediante la técnica TUNEL un aumento de las tasas de fragmentación del ADN cuando los espermatozoides presentan vacuolas grandes [17, 48, 57, 59, 60]. Pero otros, no confirman que las alteraciones cromosómicas causadas por la fragmentación del ADN estén relacionadas con la presencia de este tipo de formaciones [55, 61]. La controversia de resultados parece ser debido a la falta de estandarización de los estudios [51].

Por otro lado, el equilibrio cromosómico mediante la técnica de FISH en espermatozoides con vacuolas muestra un aumento en las tasas de aneuploidías. Sin embargo, no se muestran diferencias significativas [55, 57, 61]. Además, la ausencia de vacuolas parece no ser la causa para encontrar un equilibrio cromosómico en el espermatozoide [62, 63].

En la literatura nos encontramos numerosos estudios que han analizado el impacto de la IMSI en los resultados de un ciclo de microinyección espermática,

Introducción

valorando las tasas de fecundación e implantación, las calidades embrionarias, el embarazo clínico, el aborto y finalmente el embarazo a término.

Los primeros estudios se llevaron a cabo en parejas que necesitaban de TRA por factor masculino y donde tras realizar dos ciclos de ICSI no se conseguían embarazos. Estos autores mostraron beneficios significativos de la IMSI en todos los resultados finales del ciclo [30, 34, 35].

Posteriormente, e independientemente de la indicación, se han mostrado igualdad en las tasas de fecundación y las calidades embrionarias cuando la selección espermática es realizada mediante MSOME [31, 49, 64-66]. Sin embargo, los resultados en término de tasas de implantación y posibilidad de embarazo [17, 30, 49, 64, 65], así como la disminución de los abortos [31] si se han mostrado significativamente mejores cuando se trabaja con IMSI.

También se ha documentado que en pacientes con diferentes grados de fragmentación del ADN espermático y fallos de implantación, la realización de IMSI permite excluir de la microinyección a espermatozoides con alta vacuolización, haciendo que las tasas de implantación y el porcentaje de nacido vivo aumenten considerablemente [49].

Pero los fallos de implantación o reiterados abortos no son la única indicación que se ha determinado para realizar una IMSI. La calidad morfológica del espermatozoide en un primer ciclo también se ha establecido como un condicionante de los resultados. Se supone que el hecho de tener que seleccionar espermatozoides de peor pronóstico, que son aquellos que tienen algún parámetro morfológico afectado, también hace disminuir las tasas [35].

Sin embargo, también encontramos estudios que no muestran beneficios de la IMSI, ni en casos de factor masculino [67], ni en casos de fallo de implantación [68], ni en una población no seleccionada [69].

Con la introducción clínica de la IMSI, se han destapado pequeños defectos de la microscopía óptica usada de forma tradicional en los laboratorios de reproducción asistida. Los microscopios invertidos actuales donde se realiza la selección espermática están acoplados a la óptica de contraste por modulación de Hoffman [67, 70]. La principal desventaja a la que se enfrenta este sistema de microscopía es el bajo poder de resolución, ofreciendo un máximo de 400 aumentos para valorar ciertas características morfológicas del espermatozoide, como pueden ser las vacuolas [30], anomalías de la pieza intermedia [71], etc.

Pero, utilizar un microscopio invertido con contraste de interferencia diferencial de Nomarski, usando objetivos de 60x o 100x, parece ser la forma más adecuada para llevar a cabo este tipo de evaluaciones [18, 70], ya que se pueden conseguir como mínimo entre 900 y 1500 aumentos. Pero, hay que tener en cuenta que la óptica de Nomarski exige acoplar al microscopio una serie de elementos ópticos de elevada precisión y coste. Siendo en este caso, el microscopio de contraste por modulación de Hoffman una solución menos compleja y económica [72]. Simplemente el material para examinar los especímenes encarece el proceso, por ejemplo con la óptica de Hoffman se pueden visualizar los espermatozoides utilizando una base de plástico, mientras que en Nomarski es necesario una base de cristal. Aunque, a pesar de que el tratamiento de las muestras entre ambos sistemas suele ser diferente, se han mostrado beneficios de la óptica de contraste de interferencia diferencial de Nomarski para realizar una IMSI, incluso siguiendo el mismo protocolo [35].

Sin embargo, el alto coste, la necesidad del entrenamiento de los embriólogos, e incluso el tiempo requerido para llevar a cabo el proceso de la selección espermática, es una de las desventajas a las que se enfrenta el sistema óptico de contraste de interferencia diferencial de Nomarski si lo comparamos con la óptica de contraste por modulación de Hoffman [73].

Introducción

Después de ver lo importante que puede ser una correcta selección morfológica de los espermatozoides en los resultados de un ciclo de microinyección espermática, y la importancia diagnóstica que algunos autores han establecido de las vacuolas nucleares de los espermatozoides, hay que plantearse sí el sistema óptico actual continua siendo válido para llevar a cabo la selección espermática antes de la microinyección.

Por otro lado, no encontramos referencias de ningún estudio que haya valorado la selección espermática mediante la óptica de contraste de interferencia diferencial de Nomarski para realizar una IMSI dentro de un programa de donación de óvulos. Además, en todos los trabajos realizados se ha descartado el uso de muestras congeladas.

Con lo cual, con todo lo mencionado anteriormente, creemos que sería una buena oportunidad evaluar los resultados de los ciclos de ovodonación que se han realizado en nuestro centro con las dos ópticas de contraste con las que trabajamos de manera habitual para realizar la microinyección espermática: el contraste por modulación de Hoffman y el contraste de interferencia diferencial de Nomarski, Los resultados se valorarían tanto con muestras homólogas, como con heterólogas, procedentes de eyaculados en fresco o congelados.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Con estos antecedentes nos planteamos:

Hipótesis:

Se ha postulado que una buena selección morfológica de los espermatozoides está relacionada con los resultados de un ciclo de microinyección espermática, por lo tanto puede ser que el empleo de una técnica de microscopía frente a otra, para la selección de espermatozoides destinados al proceso de microinyección, tenga efectos significativos en los resultados finales de un ciclo. Además, se ha descrito como la microscopía de contraste de interferencia diferencial de Nomarski al tratarse de una óptica más potente que la microscopía de contraste por modulación de Hoffman, optimiza la selección de espermatozoides de mejor pronóstico. El empleo de esta técnica ha mostrado beneficios en las tasas de implantación, la gestación clínica, el aborto y el embarazo a término. Sin embargo, quedan por definir perfiles de pacientes que pudiesen beneficiarse de esta óptica más que otros. Los resultados podrían redundar en la determinación de qué método de microinyección es el más óptimo para cada pareja, así como evitar el uso de recursos adicionales, tanto para los pacientes, como para el centro de reproducción asistida.

Objetivos:

Mediante un estudio prospectivo no randomizado, y utilizando un programa de donación de óvulos a pacientes receptoras, pretendemos:

1. Comparar los resultados clínicos obtenidos en la población de estudio dependiendo del tipo de microscopía de contraste empleada para la selección de espermatozoides destinados a realizar la microinyección espermática.
2. Realizar grupos y subgrupos de pacientes dentro de la población de estudio, para comparar los resultados clínicos obtenidos dependiendo del tipo de

microscopía de contraste empleada para la selección espermática previa a la microinyección.

Para ello, dentro de la población general, se tendrá en cuenta la procedencia de las muestras seminales para organizar distintos grupos de estudio:

2.1 Grupo de eyaculados en fresco.

2.2 Grupo de eyaculados congelados.

2.3 Grupo de semen de donante.

Y en los pacientes con muestras seminales de origen homólogo, de procedencia fresco o congelado, se tendrá en cuenta el tipo de muestra para la formación de subgrupos:

2.4 Subgrupo con muestras teratozoospermicas.

2.5 Subgrupo con muestras oligoastenoteratozoospermicas.

2.6 Subgrupo con muestras con un índice de fragmentación del ADN espermático.

3. Definir qué tipo de pacientes pueden beneficiarse de la selección de espermatozoides con la microscopía de contraste por interferencia diferencial de Nomarski.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS

El estudio se realizó en la clínica Ginefiv S.L. utilizando las siguientes infraestructuras y recursos materiales:

Equipos utilizados en la consulta de Ginecología:

-Ecógrafo TOSHIBA SSA-530 (Toshiba Medical Systems S.A. Madrid), con sonda transvaginal y abdominal. Se utilizaron para el control ecográfico del ciclo de receptoras y donantes, y para el seguimiento del embarazo: visualización de saco gestacional (SG) y latido cardiaco fetal (LCF)

Equipos utilizados en la zona de quirófano:

-Ecógrafo TOSHIBA SSA-530 (Toshiba Medical Systems S.A. Madrid), con sonda transvaginal y abdominal acoplado a bomba de vacío (LABOTECT 4014, Bovenden-Göttingen, Alemania) con aguja de punción 7G. Este ecógrafo se utilizó para realizar punciones ováricas y/o transferencias embrionarias.

-Ecógrafo ALOKA SSD-1700 (Hitachi Medical Systems Europe Holding AG, Suiza) acoplado a sonda abdominal. Se utilizó para hacer transferencias embrionarias.

-Estación de anestesia FABIUS TIRO (Dräger Medical Hispania S.A., Madrid). Con este equipo se realizó la monitorización de las donantes durante la punción ovárica.

-Superficie calefactada (Hot Plate 062, LABOTECT, Alemania). Utilizado para mantener los líquidos foliculares a 37°C antes de pasarlos a la zona del laboratorio.

-Autoclave STURDY SA-230 FA (Sturdy Industrial Steam Co., Ltd. Taiwán). En él, se autoclavó todo el instrumental de acero inoxidable del laboratorio y quirófano.

Equipos utilizados en el laboratorio de FIV:

Materiales y Métodos

-Campanas flujo laminar con superficie calefactada y sistema de CO₂ acoplado (K Systems Corporation, América), acoplada a un microscopio estereoscópico Nikon (Nikon Corporation, Japón). Esta fue la zona destinada para la manipulación de gametos, embriones y preparación de placas de cultivo.

-Incubadoras C-200 (LABOTECT, Alemania). Se utilizaron para la incubación de muestras espermáticas, óvulos y el cultivo de los embriones.

-Microscopios invertidos Nikon TE 2000S y Nikon Eclipse Ti (Nikon Corporation, Japón) con superficie calefactada (Tokai Hit Thermo Plate, Olympus Corporation, Japón) y acoplados a microinyectores Narishige (Narishige Corporation, Japón).

-El microscopio Nikon TE 2000S acoplado al sistema de contraste de fases por modulación de Hoffman se utilizó para realizar la selección espermática a 400 aumentos.

-Sistema de microscopía de contraste de fases por interferencia diferencial de Nomarski y selector de aumento 1.5x acoplado al invertido Nikon Eclipse Ti. Esta óptica de contraste se utilizó para seleccionar los espermatozoides a 900 aumentos.

-Microscopio invertido DIAPHOT 200 (Nikon Corporation, Japón) con superficie calefactada (Tokai Hit Thermo Plate, Olympus Corporation, Japón). Se utilizó para la valoración morfológica de óvulos y embriones.

-Pipetas automáticas de distinto calibrado (NICHIPET EX, NICHIRYO, América; GILSON, Francia).

-Controladores de temperatura y concentración de CO₂ (InControl, LABOTECT, Alemania). Se utilizaron para realizar un control diario de las temperaturas y CO₂ de las estufas incubadoras.

-Torres con filtros CODA (Gen X International, América) para la filtración de posibles compuestos volátiles.

Equipos utilizados en el laboratorio de Andrología:

-Superficies calefactadas (Hot Plate 062 LABOTECT, Alemania). Se utilizaron para mantener las muestras espermáticas 37°C.

-Campana de flujo laminar horizontal TELSTAR V-100 (TELSTAR GROUP, Barcelona) con microscopio invertido NIKON TMS (Nikon Corporation, Japón). Esta zona se destinó para el capacitado de muestras y valoración espermática.

-Dos centrifugas KUBOTA 2100 (Cubata Corporation, Japón). Se utilizaron para el lavado de las muestras espermáticas durante la capacitación y descongelación de muestras.

-Bancos de criopreservación de muestras en N₂ líquido (Air Liquide Medicinal S.L., Madrid).

-Microscopio de campo claro LEICA DMS750 (Leica Microsystems, Alemania). Se utilizó para la realización de la prueba de la morfología espermática.

-Contador de células LEOCOFORM (Crison Instruments, S.A., Barcelona). Se usó para el recuento de espermatozoides durante la valoración de la morfología espermática.

-Nevera THERMOLABIL (Liebherr, Alemania) para el mantenimiento de medios de cultivo.

-Pipetas automáticas de distinto calibrado (NICHIPET EX, NICHIRYO, América; GILSON, Francia).

Por último, se contó con un programa informático gestionado por Ginefiv, donde quedó registrada toda la información relacionada con cada paciente. Este sistema se utilizó para reportar las historias clínicas incluidas en el diseño del estudio.

2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se seleccionaron de forma prospectiva y no randomizada todos los ciclos de ovodonación realizados en nuestro centro, GINEFIV, durante el periodo comprendido entre Enero de 2009 y Septiembre de 2011. Se consideraron los siguientes criterios de exclusión:

- Ciclos de diagnóstico genético preimplantacional (DGP).
- Ciclos con transferencia embrionaria en día +2 y día +5 de desarrollo (Cultivo largo).
- Ciclos con muestras espermáticas diagnosticadas con Criptozoospermia ($\leq 1 \times 10^6$ millones/ml), tanto en un seminograma previo, como en el día de la microinyección espermática.
- Ciclos con muestras espermáticas procesadas por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, del inglés, Polymerase Chain Reaction) para detección de carga viral en pacientes con HIV, HCV y HBV.
- Ciclos sin realización de seminograma previo en nuestro centro.
- Ciclos con muestras diagnosticadas con FISH alterado.
- Ciclos con menos de 7 óvulos microinyectados.
- Ciclos sin transferencia embrionaria.

El resultado de dicha selección fue de 1499 pacientes. Entre todos ellos, el proceso de microinyección espermática se realizó por la técnica IMSI en 934 pacientes, mientras que la técnica ICSI se realizó en 565 pacientes, (Figura 1).

3. SELECCIÓN DE DONANTES DE ÓVULOS

La selección y aceptación de donantes en nuestro centro se hizo siguiendo el marco jurídico regulador de la reproducción asistida en España, que está constituido

actualmente por la Ley 14/2006 del 26 de Mayo. Siguiendo esta ley, todas las donaciones fueron anónimas y no lucrativas. Se seleccionaron donantes mayores de edad que no superasen los 35 años, con un estado psicofísico adecuado y con menos de 6 hijos nacidos vivos. Durante el estudio de aceptación, se valoró que la donante tuviera plena capacidad de obrar, buenos hábitos y compatibilidad y similitud, inmunológica y fenotípica (raza, peso, talla, textura de pelo y color de ojos), con la receptora. Se evaluó su historia reproductiva (embarazos, abortos, hijos, etc.). Se le realizó un cultivo endocervical de Chlamydias y Gonococo, y una citología cervico-vaginal. Seguidamente, hubo que descartar que no existiese ningún tipo de enfermedad hereditaria, ni en el entorno familiar, ni en la propia donante. Para ello, se le realizó un cariotipo en sangre periférica, pidiendo consentimiento informado según lo dispuesto en la ley 14/2007 de investigación biomédica, para eludir posibles desordenes genéticos. Además, se realizaron serologías para descartar presencia de enfermedades infecciosas transmisibles. Las donantes que cumplieron todos los requisitos y aceptaron bajo consentimiento informado la donación de óvulos a una paciente receptora (en el marco de la Ley 14/2006), fueron informadas de los riesgos de la hiperestimulación ovárica y de la punción folicular.

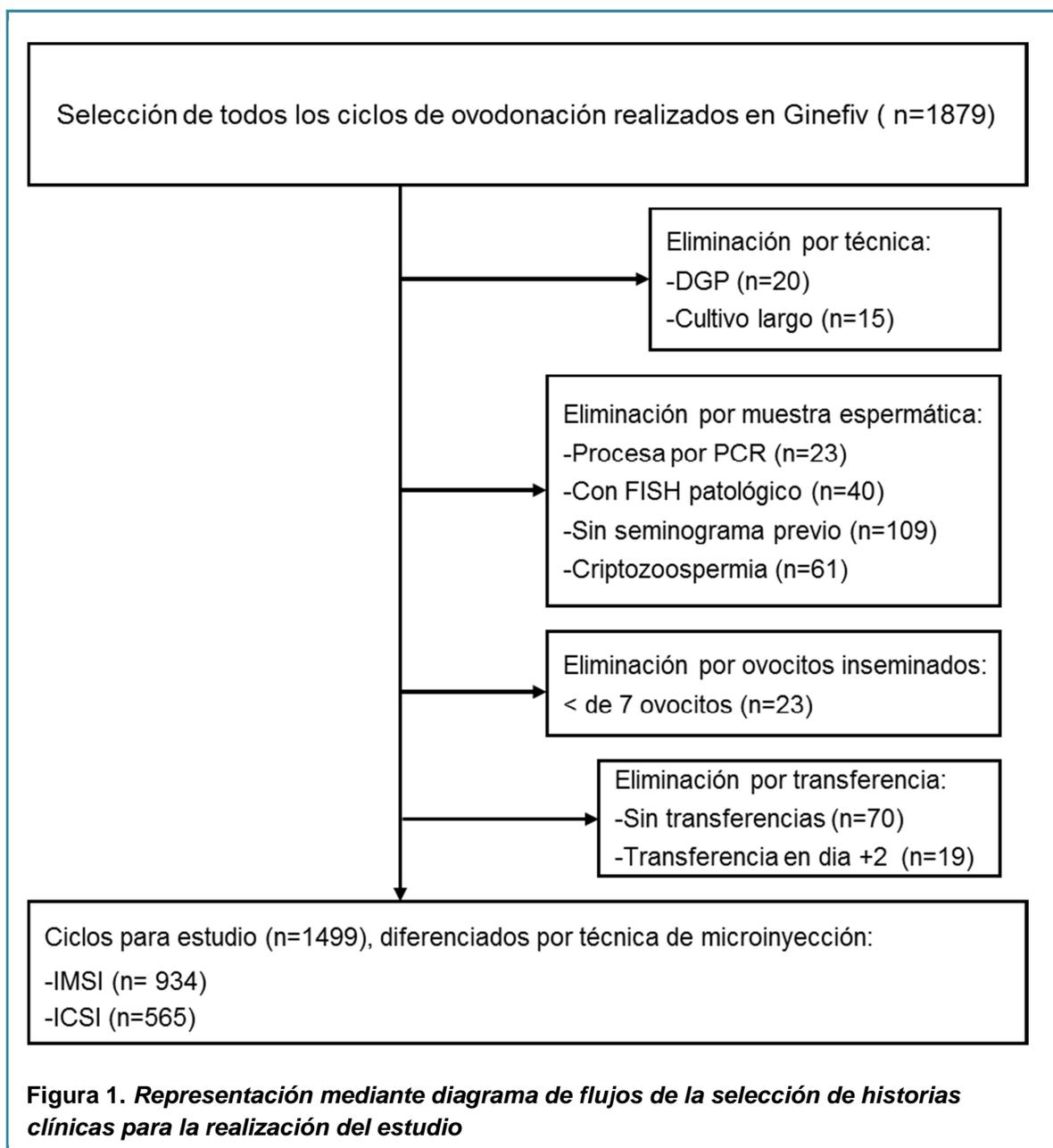
4. RECEPTORAS DE ÓVULOS

Las principales indicaciones para ser receptoras de óvulos fueron: menopausia, fallo ovárico precoz, fallo ovárico por quimioterapia o radioterapia, ser portadoras de alteraciones genéticas o tener disgenesias gonadales, haber sufrido fallos repetidos de FIV por causa ovocitaria, por factor etario o baja respuesta y/o ovarios inaccesibles.

A todas las receptoras se les explicó, mediante consentimiento informado, la técnica de fecundación *in vitro* con óvulos de donante. Se les informó de cuando está indicada dicha técnica, así como del procedimiento, los resultados y los riesgos. Siguiendo los aspectos legales en el marco jurídico de la Ley 14/2006 sobre técnicas

Materiales y Métodos

de reproducción asistida, se les informó del procedimiento con donantes y los contratos de donación (Artículo 5, apartados 1, 5 y 6), la determinación legal de la filiación (Artículo 8, apartado 1, 2 y 3), la premoriencia del marido (Artículo 9, apartados 1, 2 y 3) y la crioconservación de gametos y preembriones (Artículo 11, apartados 3, 4, 5 y 6). Cuando la técnica de fecundación *in vitro* fue con óvulos de donante y semen de donante se les informo de los apartados del Artículo 5, 8 y 11, y del Artículo 6 apartado 4 (Usuario de las técnicas), relacionado con la elección del donante de semen por parte del equipo médico.



5. PREPARACIÓN Y SINCRONIZACIÓN DEL CICLO ENTRE DONANTE Y RECEPTORA

La estimulación ovárica de las donantes se realizó mediante un ciclo corto con antagonistas de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y un anticonceptivo previo durante al menos 14 días. La medicación utilizada fue FSHr (Gonal, Serono; Puregón, MSD) a dosis moderadas, entre 100UI-225UI. La punción ovárica se programó cuando por ecografía se visualizaron al menos 3 folículos superiores a 17mm, administrando un bolo de análogos de GnRH (Decapeptyl 0.2 mg) 36 horas previas a la punción ovárica. La punción se realizó bajo anestesia general tipo sedación y control ecográfico según el protocolo habitual del centro.

La preparación endometrial en las pacientes receptoras se realizó mediante ciclo sustitutivo y supresión hipofisaria previa. Para el tratamiento de supresión hipofisaria se emplearon anticonceptivos orales en pauta continua, Yasmin (BAYER) o Edelsin (EFFIK), o análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), Decapeptyl 3.75 intramuscular (IPSENPHARMA), en la fase lútea del ciclo previo. La elección de una medicación u otra se realizó según la edad de la paciente, índice de masa corporal, tabaquismo, otros factores de riesgo trombogénicos y si existía buena tolerancia previa. En los casos en los que la función ovárica era inexistente al inicio del tratamiento, se realizó directamente preparación endometrial sin supresión hipofisaria previa. La preparación endometrial en todos los casos se hizo mediante un ciclo sustituido administrando estrógenos: Progynova (BAYER) o Meriestra (NOVARTIS) por vía oral a dosis entre 4-8mg/día o bien Estradem Matrix (NOVARTIS) por vía transdérmica a dosis de 50-150mg/3 días, con el fin de conseguir un endometrio trilaminar (≥ 7 mm). El día de la punción ovárica de la donante, la receptora comenzó con una suplementación de gestágenos en forma de progesterona natural micronizada, Progeffik (EFFIK) o Utrogestán (SEID), por vía oral o vaginal, con una dosis de 600-800mg/día.

La transferencia embrionaria se realizó en todos los casos en el día +3 de desarrollo embrionario. En los casos en los que se confirmó gestación, se mantuvo la administración de estrógenos y progesterona en la misma pauta que se había administrado previamente, hasta un máximo de 100 días (8^a-12^a semana de gestación), disminuyendo las dosis de una manera progresiva.

6. ESTUDIO BÁSICO DE LA INFERTILIDAD MASCULINA: SEMINOGRAMA

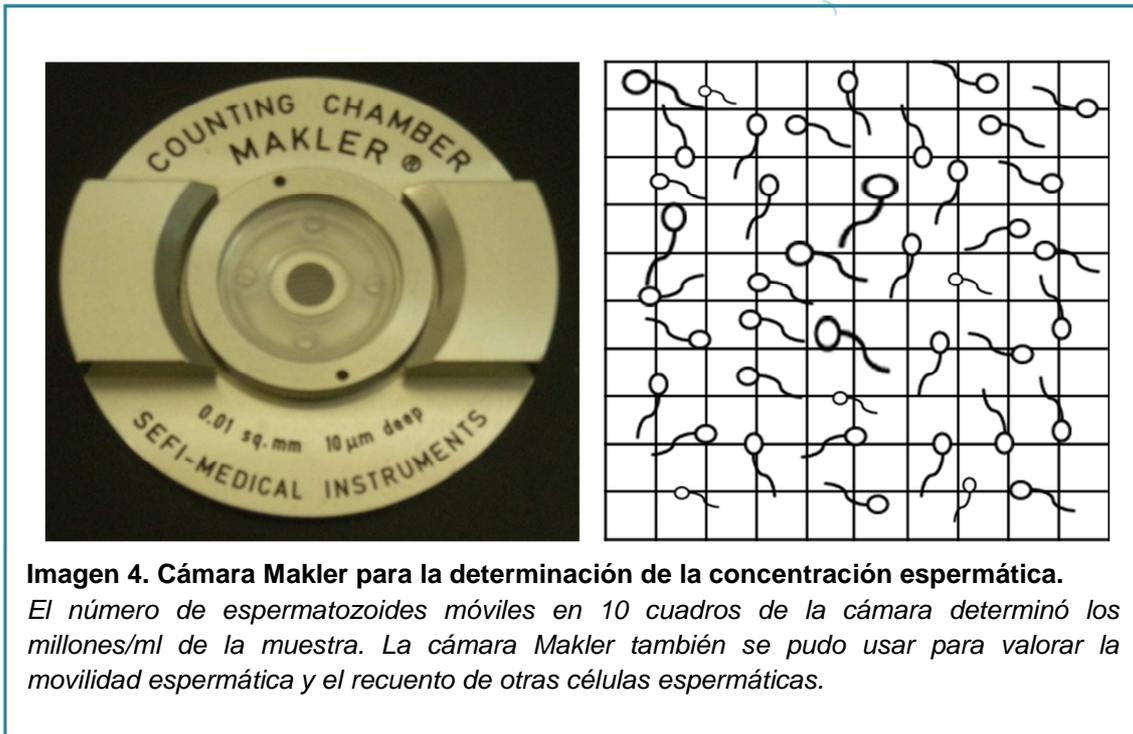
Para la realización del seminograma las muestras espermáticas fueron recogidas por masturbación en un recipiente de orina estéril, habiendo mantenido los pacientes una abstinencia sexual entre 2 y 7 días máximos. En todos los casos se confirmó que la recogida había sido completa y que no hubo pérdida de muestra, ya que el diagnóstico en estos casos podría haber sido erróneo.

El estudio de la muestra se hizo siempre en una cabina de flujo laminar horizontal y a temperatura ambiente. La muestra se mantuvo no más de 90 minutos sobre superficie calefactada a 37°C para permitir su licuefacción. Si pasado este tiempo la muestra no licuo, se trató con tripsina. Posteriormente, se valoró siguiendo la recomendación del protocolo de la OMS 1999 y 1992 [43, 74]

El estudio macroscópico comprendió la valoración del aspecto, olor, y el volumen de la muestra ayudándonos con jeringas graduadas de 10ml y con aspirador mecánico Falcón, así como de la medición del pH mediante tiras reactivas pH Merck (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania).

El estudio microscópico se dividió en las siguientes partes: por un lado, se determinó la concentración espermática utilizando 10 µl de la muestra y valorando en una cámara Makler bajo el microscopio invertido y con el objetivo 20x. La cámara Makler consta de una cuadrícula de 1mm dividida en 100 cuadros, con una profundidad de 10 µm. Los espermatozoides contados en 10 cuadros determinaron la concentración en millones por mililitro (Imagen 4). Por otro lado, se dispusieron 15 µl

sobre un portaobjetos tapando la microgota con un cubreobjetos de 24mmx24mm. Después, mediante contraste de fase y con el objetivo 40x, se valoró la presencia de leucocitos por campo o de otras células no espermáticas, como por ejemplo células de descamación, así como la presencia de aglutinaciones espermáticas. También se determinó el tipo de avance o movimiento, y la velocidad de los espermatozoides.



Finalmente, entre 5-15 µl de la muestra fueron reservados a la extensión sobre portaobjetos para su posterior tinción y valoración de la morfología espermática. La muestra que quedó en el recipiente estéril se mantuvo 24 horas en el laboratorio para el consiguiente estudio de contaminación bacteriana en plasma seminal. En el caso de existir contaminación seminal, se realizó cultivo seminal con antibiograma y si dio positivo para alguna bacteria patógena, el paciente fue tratado con antibióticos. Posteriormente, se volvió a repetir seminograma dando el visto bueno para iniciar el ciclo de recepción una vez que el cultivo seminal diera negativo.

De la prueba del seminograma se recogieron los datos de volumen, concentración, movilidad y morfología.

6.1 Movilidad espermática.

La movilidad se evaluó tal y como se describe en el apartado anterior. Siguiendo las recomendaciones de la OMS 1999 se distinguieron cuatro categorías según movimiento y velocidad espermática:

-Tipo A y B, fueron todos aquellos espermatozoides progresivos, siendo los B espermatozoides que se desplazaban pero no a gran velocidad, ni con movimiento rectilíneo muy definido.

-Tipo C, espermatozoides con movimiento pero que no fueron capaces de desplazarse de forma rectilínea. Realizaban movimientos *in situ* o circulares.

-Tipo D, espermatozoides parados y que no mostraron ningún tipo de movimiento.

Para realizar el estudio, se recogió el porcentaje de espermatozoides progresivos (A+B).

6.2 Morfología espermática.

Dependiendo de la concentración de la muestra, las extensiones se prepararon con 5-15 μ l de la muestra y siempre por duplicado. Sobre un portaobjetos limpio con Etanol 70°C se dispuso la microgota de muestra y ayudándonos con otro porta se extendió. La tinción se realizó siguiendo el protocolo de la tinción de Wright con reactivos Panreac Applychem (Panreac Química S.L.U.). Tras 20 minutos en la solución fijadora (Etanol 90°C), se pasó por Eosina 5 minutos, y por Azur B 2 minutos. El proceso terminó aclarando con agua destilada y dejando secar el portaobjetos. La morfología se valoró en 100 espermatozoides, con el objetivo de 100x previamente cubierto con aceite de inmersión. Se realizaron contajes por el mayor número de campos posibles. En el recuento solamente se tuvieron en cuenta las células

reconocidas como espermatozoides, saliendo del estudio aquellas células espermáticas inmaduras.

Se consideró un espermatozoide morfológicamente normal cuando el tamaño y forma de su cabeza, las características del cuello y de la pieza intermedia, y su cola se establecieron dentro los valores de referencia marcados por la OMS de 1992 [74]. Una cabeza normal tuvo que medir entre 4 y 5 μm de largo y entre 2,5 y 3,5 de ancho, y presentando un acrosoma bien definido que no ocupará más del 40% del total. La morfología anormal de cabeza fue característica de cabezas cónicas, piramidales, globulares, totalmente amorfas, vacuoladas y/o con acrosomas pequeños. El cuello, aproximadamente de 1 μm de ancho, debía encontrarse bien unido a la cabeza y medir menos de la tercera parte que ésta. Los cuellos doblados, mal insertados y demasiados gordos o finos fueron considerados anormales. La presencia de gota citoplasmática no superó un tercio del volumen de la cabeza espermática. La cola fue siempre más fina que el cuello y mantuvo unos 45 μm de largo y sin encontrarse doblada o enrollada (Imagen 5).

Para realizar el estudio, se recogió el porcentaje de espermatozoides normales.

6.3 Diagnóstico de las muestras seminales.

El diagnóstico de las muestras se hizo siguiendo los valores de referencia establecidos por el manual de la OMS de 1999. Para considerar una muestra normal o normozoospermica se tuvo que cumplir tener un volumen mayor o igual a 2 ml, un pH superior a 7,2, una concentración espermática de 20 millones por ml, que el 50% de los espermatozoides tuvieran velocidad progresiva o más del 25% de los espermatozoides con velocidad tipo A, más del 50% de los espermatozoide vivos y menos de 1×10^6 leucocitos por ml. La morfología espermática se recogió siguiendo el manual de la OMS de 1992, el cual establecía que al menos el 30% de los espermatozoides tenían que ser morfológicamente normales.

Siguiendo estos valores de referencia y teniendo en cuenta concentración, movilidad y morfología espermática, los diagnósticos de las muestras recogidas en el estudio fueron los siguientes:

-Normozoospermia.

-Oligozoospermia, cuando la concentración por ml de espermatozoides fue inferior al valor de referencia.

-Astenozoospermia, cuando la velocidad progresiva se encontró por debajo del valor de referencia.

-Teratozoospermia, cuando el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales fue menor que el establecido.

El seminograma es considerado un estudio mínimo y básico para orientar la infertilidad masculina. Además, actualmente es la única herramienta diagnóstica recomendada por la OMS como una evaluación objetiva del potencial fértil. Por otro lado, y aunque el estudio andrológico completo es aconsejable [5], no se realizó en todos los paciente, por lo que datos de interés urológico no fueron recogidos para el estudio. Tampoco se recogieron datos de la historia reproductiva del paciente.

7. ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN ESPERMÁTICA

Para la determinación de la fragmentación se siguió el protocolo del kit Halosperm® basado en el test de la dispersión de la cromatina (SCD) [56]. Con este test se consigue por un lado realizar un proceso de desnaturalización del ADN, y por otro extraer las proteínas nucleares, para dar lugar a nucleótidos parcialmente desproteínados y provocar que los bucles de ADN se expandan. El resultado es la observación de distintas formas morfológicas de los espermatozoides según la expansión de los bucles de ADN. Por ejemplo, la desnaturalización provoca que

cadena de ADN que tengan alguna rotura sean separadas a cadena sencilla y el bucle o halo formado sea menor.

Para realizar la prueba de la fragmentación del ADN de los espermatozoides, las muestras fueron recogidas por masturbación en un recipiente de orina estéril, habiendo mantenido todos los pacientes una abstinencia sexual entre 1 ó 2 días. Tras valorar los parámetros de leucospermia, volumen, concentración y movilidad, se criopreservó a -18°C una alícuota de la muestra en tubo Eppendorf. Una vez descongelada a temperatura ambiente, la muestra fue diluida con Gamete (VITROLIFE) hasta conseguir una concentración final de 5-10 millones/ml. Después se procedió a la inmersión de 40-45 μl de la muestra en un gel de agarosa. Un volumen de 15 μl de la mezcla anterior se dispuso sobre un portaobjetos pretratado con agarosa y se extendió con la ayuda de un cubreobjetos. El cubreobjetos fue retirado, aproximadamente 10 minutos después, cuando la muestra gelificó en nevera a 4°C . El portaobjetos se introdujo, siguiendo este orden, 7 minutos en solución desnaturizante, 25 minutos en solución de lisis y 5 minutos en agua destilada. La deshidratación se hizo con Etanol de menor a mayor concentración (70, 90 y 100%) permaneciendo 2 minutos en cada concentración. Para la tinción se utilizó solución de Wright mezclada con solución fosfato 1:1 durante 7-10 minutos. Tras el secado, se procedió a la observación de la muestra bajo el microscopio con el objetivo 100x previamente cubierto con aceite de inmersión, y se contaron 500 espermatozoides por muestra. Los espermatozoides fueron clasificados según tipo de halo o ausencia de éste, siguiendo el criterio del protocolo. Los espermatozoides con halo grande o mediano, fueron considerados como espermatozoides sin ADN fragmentado, es decir, con el ADN intacto. Mientras que, los espermatozoides con halo pequeño, sin halo o degradados, fueron considerados espermatozoides con ADN fragmentado (Imagen 6).

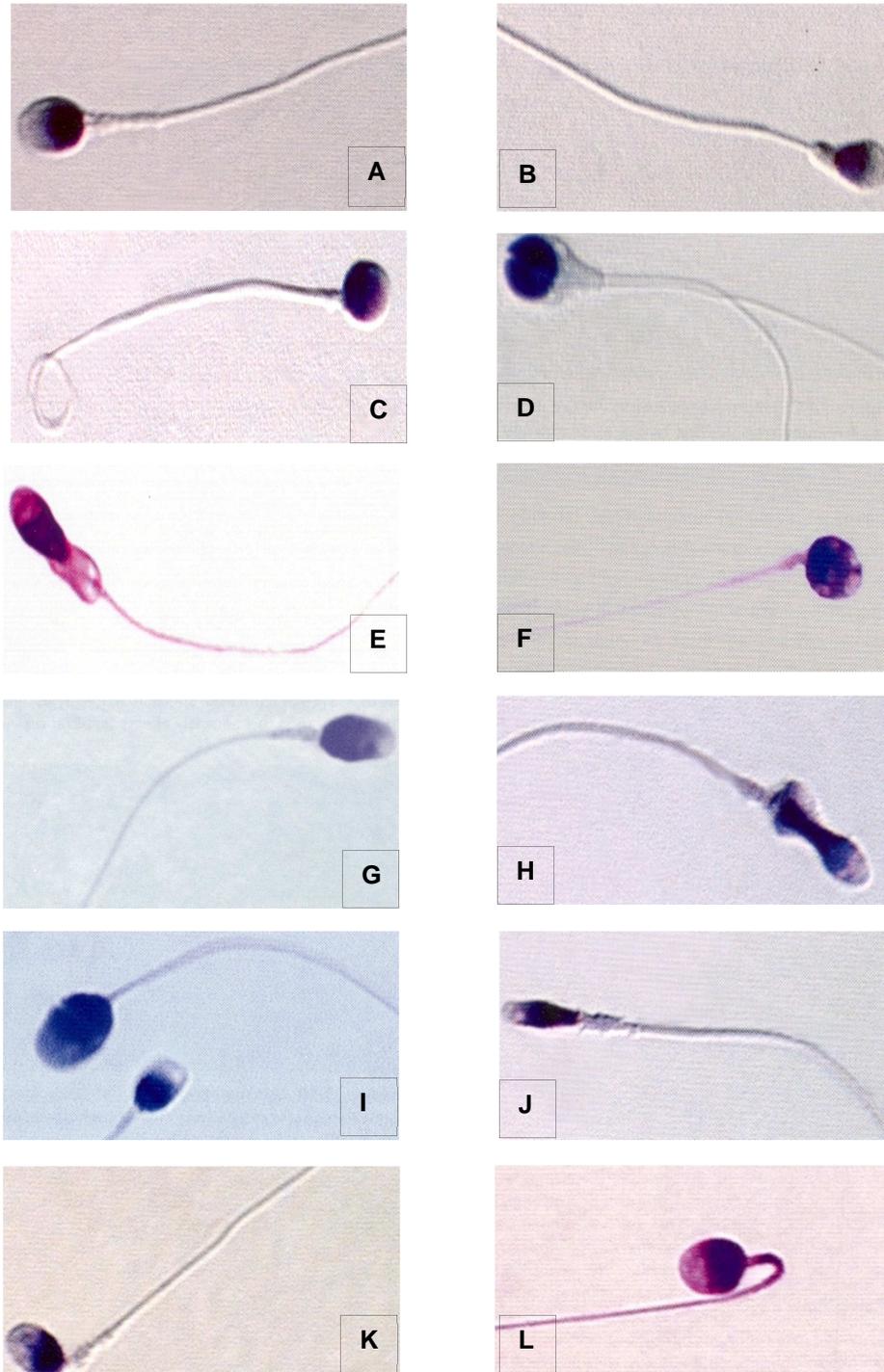


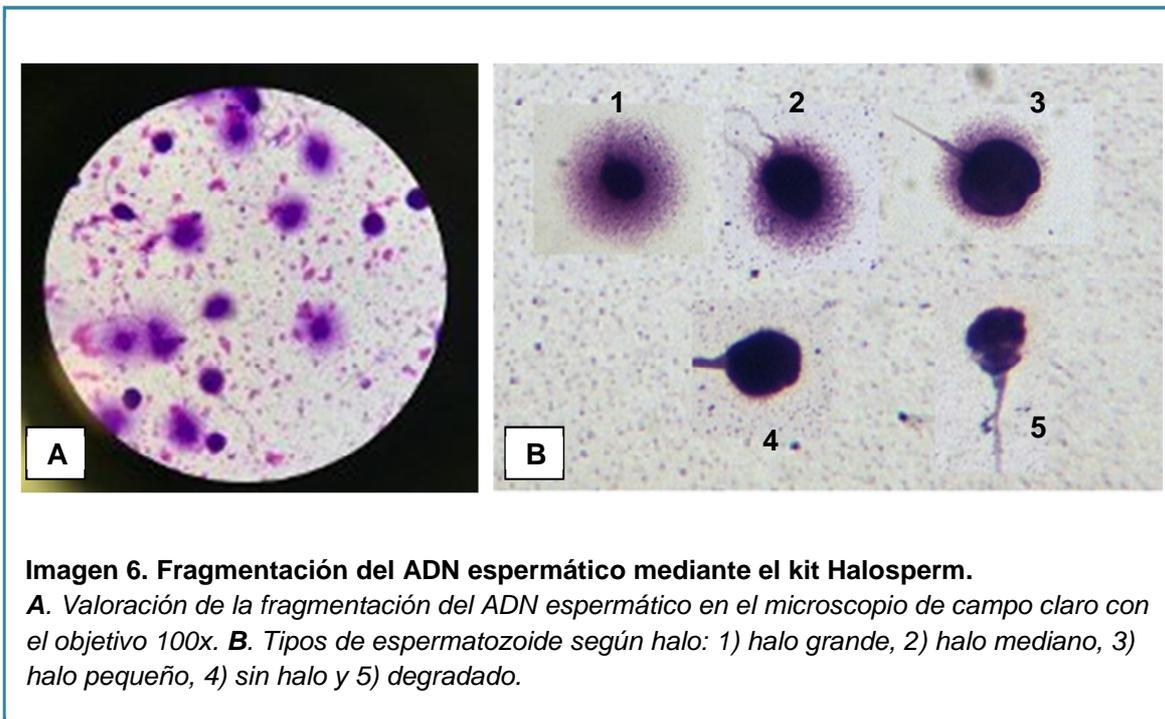
Imagen 5. Tipos de espermatozoides según su morfología espermática.

A, espermatozoide normal. **B**, espermatozoide con cabeza piramidal y pieza intermedia engrosada. **C**, espermatozoide con cabeza globular y cola enrollada. **D**, espermatozoide con doble cola. **E**, espermatozoide con cabeza afilada y gota citoplasmática. **F**, espermatozoide con vacuolas. **G**, espermatozoide con acrosoma pequeño. **H**, espermatozoide con cabeza en forma de campana y gota citoplasmática. **I**, espermatozoide gigante. **J**, espermatozoide con cabeza afilada. **K**, espermatozoide con pieza intermedia doblada. **L**, espermatozoide con cola mal insertada.

Sobre la base de esta clasificación, y teniendo en cuenta el principio en el que está basado el test SCD se obtuvo el índice de fragmentación (IF) de la muestra. Cuando el daño del ADN es mayor al 30% se supone que el potencial de fecundación disminuye (Fernández J.L et. al., 2003).

En Ginefiv, se suele realizar la prueba de fragmentación a pacientes con ciclos previos de recepción ovocitaria que mantienen repetidos fallos de implantación, abortos y/o mala calidad embrionaria, paciente con historial clínico de infecciones genitourinarias, e incluso pacientes fumadores y expuesta a tóxicos ambientales.

En el estudio se recogieron los datos de fragmentación espermática.



8. SELECCIÓN DE DONANTES DE SEMEN.

La selección y aceptación de donantes en nuestro centro se hizo siguiendo el marco jurídico regulador de la reproducción asistida en España, constituido actualmente por la Ley 14/2006 del 26 de Mayo. Siguiendo esta ley, todas las donaciones fueron anónimas y no lucrativas, y se seleccionaron donantes mayores de

Materiales y Métodos

edad que no superaran los 35 años, con un estado psicofísico adecuado y como establece la ley con no más de 6 hijos nacidos vivos.

En una primera fase se realizó un estudio personal (historia reproductiva, hábitos, y enfermedades hereditarias de tipo genético del entorno familiar, etc.). Y posteriormente, se sometió a un análisis seminal. Si la calidad espermática superó los valores de referencia establecidos por la OMS para considerar una muestra normozoospermica, el donante fue aceptado como donante provisional. Además del seminograma básico, se realizó una prueba de congelación y descongelación, con una alícuota de la muestra, siguiendo el protocolo establecido en el punto 9.2 para la criopreservación y descongelación de muestras seminales.

Por último, se les realizó un cultivo seminal y otro de orina. Para descartar que no existiese ningún tipo de enfermedad hereditaria se realizó tanto un cariotipo en sangre periférica para eludir posibles desordenes genéticos como un estudio del gen de fibrosis quística (gen CFTR). Además, se realizó una analítica básica completa en sangre para comprobar el grupo sanguíneo y el factor RH, así como la realización de serologías pudiendo descartar la presencia de enfermedades de transmisión sexual. Finalmente, se valoraron rasgos fenotipos como raza, peso, talla, textura de pelo y color de ojos.

Una vez que todos los resultados de las pruebas fueron correctos, el donante quedó registrado como donante de nuestro banco de semen. Fue informado mediante consentimiento de que su donación era un contrato formal y confidencial concertado entre el donante y el banco de semen del centro. Todas las muestras de semen de donante fueron criopreservadas en nuestro banco para el uso diferido de la muestra.

9. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS PARA LA MICROINYECCIÓN.

Las muestras espermáticas se obtuvieron el mismo día de la punción ovárica de la donante o días previos a la punción si el paciente no pudo acudir al centro. En este último caso, la muestra seminal se criopreservó y se mantuvo en nitrógeno líquido hasta su utilización.

La capacitación de las muestras fue un requisito previo para la realización de la microinyección. Por un lado, gracias a la centrifugación por gradientes de densidad se eliminó el plasma seminal y otros constituyentes del fluido seminal, como los leucocitos, las células germinales inmaduras y otras células redondas, dejando únicamente espermatozoides viables. Por otro lado, con el método de swim-up se recuperaron únicamente espermatozoides móviles.

9.1 Capacitación seminal.

Todas las muestras fueron obtenidas por masturbación tras mantener una abstinencia sexual entre 2 y 5 días. Se procesaron en un periodo máximo de 1 hora, manteniéndolas siempre a 37°C sobre superficie calefactada. Tras la licuefacción de la muestra, se valoró volumen, concentración y movilidad y fueron diagnosticadas siguiendo los parámetros recomendados por la OMS (1999). La capacitación de la muestra se hizo mediante columnas de gradientes, del 80 y 40%, con una proporción 8:2 de Sperm Grad™ VITROLIFE y IVF™ VITROLIFE. En tubo falcón de 10 ml de fondo cónico se dispusieron 0.5 ml de cada gradiente y hasta 3 ml de semen, siempre en función de la concentración y/o volumen de la muestra. El primer centrifugado se realizó durante 20 minutos a 1000rpm. Tras recoger el pellet, éste se resuspendió en 0.7 ml de IVF™. Finalmente, se hizo un último lavado a 1200rpm durante 5 minutos. Tras decantar el sobrenadante, se añadieron entre 150 y 300 µl de IVF™ sobre el pellet. La muestra capacitada se mantuvo en estufa calefactada, durante un periodo de

tiempo que en ningún caso superó una hora, haciendo *swim-up* a 37°C hasta el momento de la microinyección.

9.2 Criopreservación seminal.

Todas las muestras seminales de donantes o de pacientes que por disponibilidad o por diferentes motivos no pudieron acudir el día de la punción de la donante, fueron criopreservadas.

Tras la recuperación de la muestra, por masturbación, licuefacción y su valoración macro y microscópica, se procedió con la capacitación tal y como hemos descrito en el apartado 9.1. La diferencia fue que tras el último centrifugado a 1200rpm durante 5 minutos se resuspendió el pellet con IVF™ y con criopreservante Sperm Freeze™ Ferti Pro, en una proporción 10:7. Tras 10 minutos en nevera, se procedió a la criopreservación de la muestra, bien en criotubos con vapores de nitrógeno líquido durante 20 minutos, o bien en píldoras usando una pastilla de nieve carbónica.

Parte de la muestra no se criopreservó y se mantuvo en el recipiente de recogida durante 24 horas para la valoración de una posible contaminación bacteriana del plasma seminal. Además, una alícuota de la muestra criopreservada fue sometida a una prueba de descongelación. Superando la prueba de descongelación y la de contaminación, la muestra se mantuvo criopreservada en el banco hasta el día de microinyección.

Para la prueba de descongelación o para descongelar la muestra el día de la punción de la donante, ésta se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Para retirar el criopreservante, se realizó un lavado a 1200 rpm durante 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante se añadió sobre el pellet entre 150 y 300 µl de IVF™. De igual modo, la muestra ya capacitada se mantuvo haciendo *swim-up*, en estufa calefactada a 37°C, hasta el momento de la microinyección, nunca superando el límite de 1 hora.

10. RECUPERACIÓN DE LOS ÓVULOS MEDIANTE PUNCIÓN TRANSVAGINAL

La punción ovárica transvaginal para llevar a cabo la recuperación de los óvulos se realizó en la zona de quirófano. La captación de los complejos cúmulo-corona-ovocito (CCCO) se realizó en cabina de flujo laminar con superficie calefactada y sistema de CO₂ acoplado. Los tubos foliculares provenientes de quirófano fueron vaciados sobre placas Falcón 100x15mm (Becton Dickison), y bajo un microscopio estereoscópico, se procedió a la captación de los CCOO mediante un sistema de aspiración acoplado a una pipeta pasteur estéril de 5.75 (Humagen™ Fertility Diagnostics, América).

Los cúmulos obtenidos se mantuvieron hasta el proceso de decumulación en placas multipocillos (NUNC™ IVF multidish) con medio de cultivo G-IVF™ PLUS VITROLIFE cubierto con aceite de parafina filtrado (OVOIL™, VITROLIFE). El cultivo se realizó a 37°C, con 6% de CO₂ y 95% de humedad relativa en estufas incubadoras C-200.

Previamente a la ICSI, se realizó la decumulación de los CCCO en placas NUNC IVF 60x15 usando hialuronidasa (HYASET™-10X VITROLIFE) y medio tamponado (G-MOPS™ PLUS VITROLIFE) en una relación 1:9. Utilizando pipetas pasteur de 5.75, los cúmulos fueron pasados por microgotas de la mezcla hialuronidasa-medio tamponado. Posteriormente, mediante Stripper Tips (Atlantic Diagnostics, América), de diámetros comprendidos entre los 135 y 150 nm, se procedió a la decumulación en G-MOPS™ PLUS en la misma cabina de flujo laminar. Tras el proceso de decumulación, los óvulos se pasaron de forma individualizada a placas de microgotas de G-IVF™ PLUS cubiertas con aceite estéril OVOIL™. Posteriormente, se procedió a la observación de los óvulos bajo un microscopio invertido, para comprobar el estado madurativo de los mismos. La clasificación de los óvulos fue: Metafase II (MII), observando óvulos en segunda división meiótica donde

se observaba el corpúsculo polar (CP), Metafase I (MI), observando óvulos en primera división meiótica donde no se observaba CP, y Profase-I (P-I) donde se observaba la vesícula germinal correspondiente a dicha fase meiótica.

Solamente fueron donados a las receptoras aquellos óvulos en estadio de Metafase II. Posteriormente, previa selección de los espermatozoides, se realizó la microinyección espermática.

11. SELECCIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDEOS.

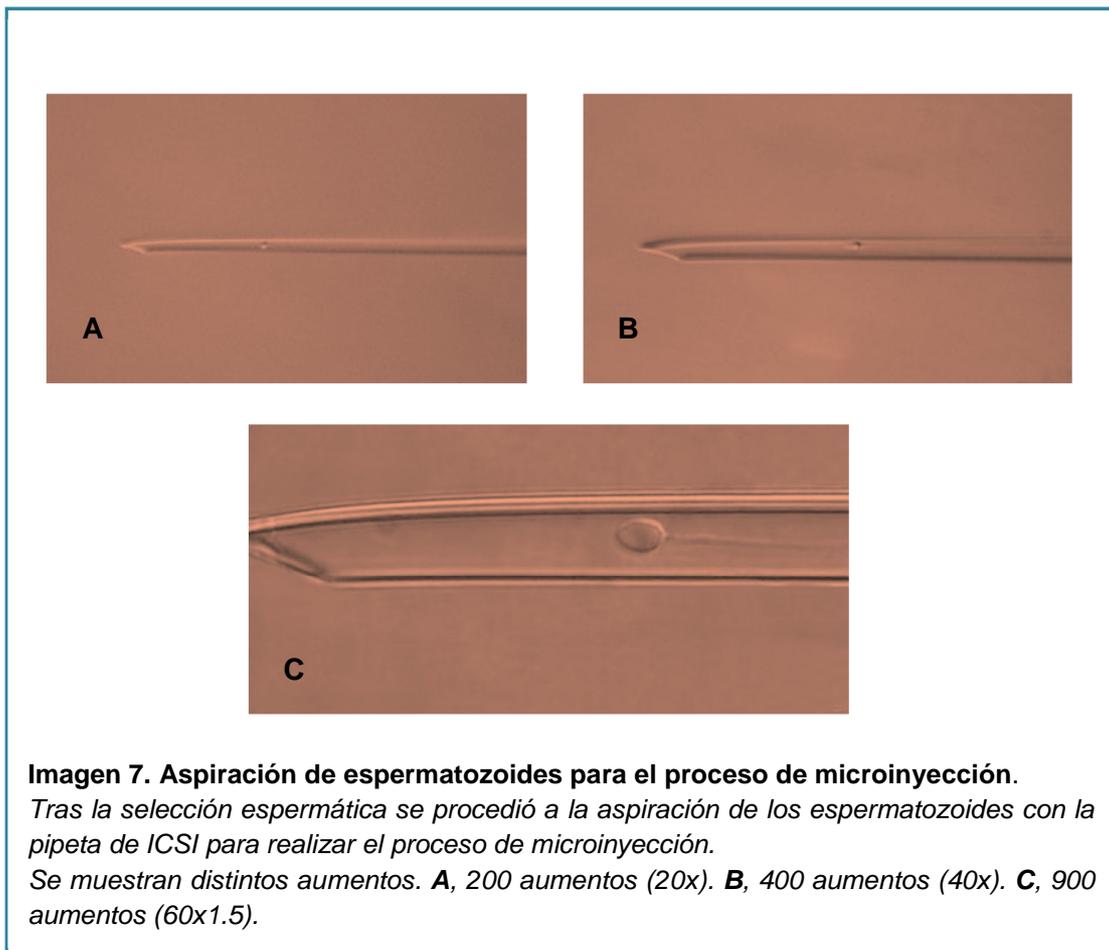
11.1. Grupo IMSI.

La selección de espermatozoides tuvo lugar a temperatura ambiente, bajo un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti acoplado al sistema de microscopía de contraste de fases por interferencia diferencial de Nomarski y a un selector de aumento 1.5x. Por requerimientos del sistema las placas usadas fueron de fondo de cristal (50x40 Willco-Dish), donde se realizaron dos microgotas de 15µl de un medio de alta viscosidad de polyvinylpyrrolidona (PVP) y albúmina humana recombinante (ICSI™ VITROLIFE) cubiertas por aceite OVOIL™. En una de las microgotas se dispusieron entre 2-3 µl de la muestra capacitada. La otra quedó libre para preparar la pipeta de ICSI mediante la aspiración de ICSI™. Es decir, se realizó el equilibrado de la pipeta.

Una vez preparada la pipeta de ICSI y enfocada a 40x se procedió a enfocar la microgota con los espermatozoides. El revólver del objetivo se cambió a 60x cubriéndolo previamente con aceite de inversión y se perfecciono el enfoque de los espermatozoides bajo la óptica de Nomarski. Para realizar el proceso de forma rápida y limpia, fue muy importante, tener siempre bien centrada y enfocada la pipeta de ICSI así como bajar el revolver antes de cambiar al objetivo de 60x. De esta manera se evitó perder del campo de visión la pipeta de ICSI e incluso romperla, con la consecuente pérdida de tiempo para terminar el proceso. Una vez que todo estuvo

listo y enfocado bajo la óptica de Nomarski se utilizó un selector de aumento de 1.5x consiguiendo ver los espermatozoides a 900 aumentos, (Imagen 7).

Los espermatozoides fueron seleccionados siguiendo los criterios de Bartoov [15], donde se descartaron de la selección aquellos que presentaron más anomalías morfológicas y en particular, mayor porcentaje de vacuolas en el área de la cabeza espermática. Mediante la pipeta de ICSI se fue procediendo a la inmovilización y aspiración. Finalmente, los espermatozoides seleccionados para microinyectar se trasladaron con la ayuda de la pipeta de ICSI a una nueva microgota de ICSI™ en una placa NUNC IVF 60x15 con microgotas de G-MOPS™ cubiertas por OVOIL™. En esta placa se realizó la microinyección.



11.2. Grupo ICSI.

La selección de espermatozoides en el grupo ICSI se hizo en un microscopio Nikon Eclipse TE2000S con superficie calefactada a 37°C, y se utilizó una placa NUNC IVF 60x15. En la placa se hicieron dos microgotas de ICSI™, y varias microgotas de G-MOPST™ PLUS, cubriéndose con aceite OVOIL™. En una de las microgotas de ICSI™ se dispusieron entre 2-3 µl de la muestra espermática capacitada. Una vez equilibrada y enfocada la pipeta de ICSI, en la microgota limpia, se procedió a la selección de los espermatozoides. Utilizando el objetivo de 40x y consiguiendo 400 aumentos, los espermatozoides fueron seleccionados por su morfología según los criterios de la OMS, y aspirados mediante la pipeta de ICSI, para posteriormente inmovilizarlos en la microgota limpia de ICSI™ (Imagen 7).

Estos espermatozoides inmovilizados fueron los que se usaron para microinyectar los óvulos en las microgotas de G-MOPST™ PLUS.

12. REALIZACIÓN DE LA MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA

El proceso de la microinyección espermática se realizó en los mismos microscopios invertidos donde se había realizado la selección de espermatozoides, con placa calefactada a 37°C, con el objetivo de 40x y con la ayuda de MICROPIPETES Humagen: HOLDING para sujetar el óvulo e ICSI para introducir el espermatozoide (Imagen 8).

Los óvulos microinyectados se cultivaron de forma individualizada en placas NUNC IVF 35x10 de microgotas de G-1™ v5 PLUs VITROLIF, y se mantuvieron en cultivo en las estufas incubadoras.

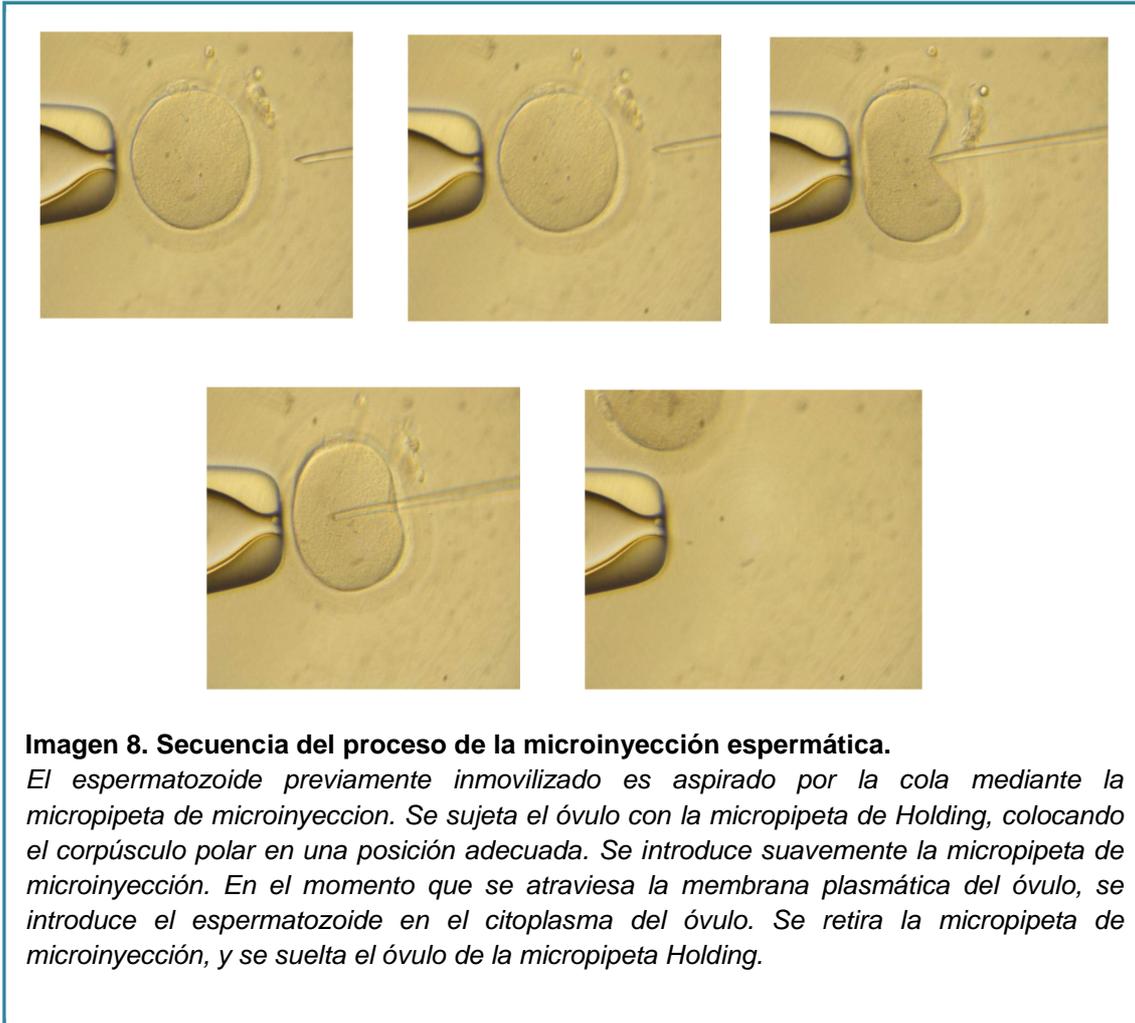


Imagen 8. Secuencia del proceso de la microinyección espermática.

El espermatozoide previamente inmovilizado es aspirado por la cola mediante la micropipeta de microinyección. Se sujeta el óvulo con la micropipeta de Holding, colocando el corpúsculo polar en una posición adecuada. Se introduce suavemente la micropipeta de microinyección. En el momento que se atraviesa la membrana plasmática del óvulo, se introduce el espermatozoide en el citoplasma del óvulo. Se retira la micropipeta de microinyección, y se suelta el óvulo de la micropipeta Holding.

13. VALORACIÓN DE LA FECUNDACIÓN Y CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA.

La evaluación de la fecundación se realizó entre las 18-20 horas post inseminación. Siguiendo las pautas de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción, (ASEBIR), solo se consideró fecundación correcta cuando se visualizaron 2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares (2PN y 2CP). Los pre-zigotos se clasificaron en función del número y posición de los precursores nucleares, y de la localización de los corpúsculos respecto a los pronúcleos, siguiendo los criterios de Scott y Smith 1998.

La división de los cigotos se evaluó siguiendo en todo momento las pautas de ASEBIR basadas en tres características principales:

Materiales y Métodos

1. Número de blastómeros y simetría, es decir igualdad o desigualdad entre el tamaño de las distintas células del embrión.
2. Ritmo de división y/o evolución del embrión hasta día +2 o de día +2 a día +3 de desarrollo.
3. Porcentaje y tipo de fragmentación celular. En un embrión viable el porcentaje de fragmentación total puede variar desde el 0 hasta el 35-40% del volumen total del embrión.

También se valoraron otras características morfológicas, como porcentaje de vacuolas en el embrión, visualización de núcleos celulares, y aspecto de la zona pelúcida (membrana que recubre y protege el embrión), haciendo que la calidad embrionaria no solo dependiera de las características principales.

En día +2 de desarrollo, y coincidiendo con las 44 horas post inseminación, se evaluaron los embriones descartándose aquellos que habían parado su desarrollo y que presentaron más de dos blastómeros multinucleadas, alto porcentaje de vacuolas y/o alta fragmentación. El día de la transferencia embrionaria coincidió en todos los ciclos con el día 3 de desarrollo embrionario. Se evaluó la calidad embrionaria entre las 67-72 horas post inseminación. Se descartaron embriones parados y/o inviábiles por alta tasa de fragmentación o alto porcentaje de vacuolas. El resto de los embriones fue evaluado teniendo en cuenta todo el patrón de desarrollo en cultivo y su morfología. Se les asignó una calidad o categoría establecida por ASEBIR (Imagen 8):

1. Categoría A: óptima calidad embrionaria y máxima capacidad de implantación.
2. Categoría B: buena calidad embrionaria y elevada capacidad de implantación.
3. Categoría C: embrión de calidad media con una capacidad media de implantación.
4. Categoría D: embrión de no muy buena calidad con baja probabilidad de implantación.

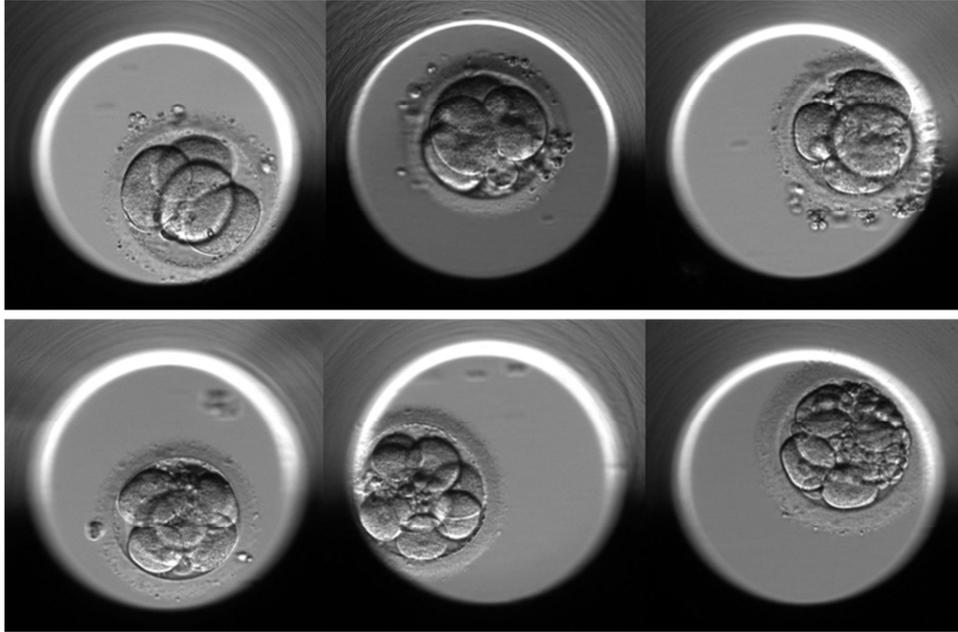


Imagen 8. Embriones con diferentes calidades y en distintos estadios de desarrollo.

En la fila superior los embriones se encuentran aproximadamente a sus 44 horas de desarrollo, mientras que la inferior corresponde a las 68-70 horas. En ambas filas, de izquierda a derecha las categorías embrionarias son A, B y C respectivamente.

Los embriones con 2 o 4 blastómeros en día +2 que evolucionaron a 7 y 9 células entre las 67-72 horas post inseminación, fueron considerados de calidad A y B. Aunque tuvieron que cumplir los requisitos de ser embriones sin blastómeros multinucleados y con bajo o inexistente porcentaje de vacuolas. Así como tener una buena simetría celular y una fragmentación menor del 20% del volumen total del embrión.

En el estudio se recogió el porcentaje de embriones de calidad A+B en día 3 de desarrollo.

14. TRANSFERENCIA EMBRIONARIA.

Los embriones seleccionados para transferir se cultivaron en una placa de cultivo multipocillos (NUNC™ IVF multidish) con G-2™ v5 PLUS VITROLIFE y en las estufas incubadoras C-200 hasta el momento de la transferencia embrionaria. El resto de los embriones viables fueron criopreservados en nuestro banco de embriones. La

transferencia de embrión único o de 2 embriones se realizó dependiendo de la decisión de las parejas, de la historia clínica, y/o de la calidad embrionaria o el número de embriones totales en el ciclo. La transferencia fue ecoguiada y se realizó vía intrauterina mediante sondas Gynetics (Gynetics Medical Products, Bélgica) o Labotect (LABOTECT, Alemania).

15. DETECCIÓN DEL EMBARAZO.

A los 14 días post transferencia embrionaria, las pacientes se sometieron a una prueba en sangre para detectar la presencia de gonadotropina coriónica humana (β HCG). El incremento de la β HCG mostró la presencia de embarazo bioquímico.

En los casos en los que el incremento de esta hormona fue positivo (>5 UI), se citó a la paciente dos semanas después para control ecográfico. Los casos donde se visualizó saco gestacional (SG) quedaron registrados. La no visualización de saco se consideró embarazo bioquímico. Las pacientes con embarazo evolutivo se citaron para nuevo control ecográfico. Se registró la visualización de latido cardíaco fetal (LCF).

El control ecográfico gestacional en nuestro centro se mantuvo hasta la semana 7-8 de gestación. El seguimiento de los embarazos a partir de estas semanas fue llevado a cabo por ginecólogos externos a Ginefiv, manteniendo nosotros un registro de todos los embarazos clínicos llegados a término.

16. ORGANIZACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

En 934 pacientes, la selección de los espermatozoides previa a la microinyección se realizó mediante microscopía de contraste por interferencia diferencial de Nomarski, formando el grupo de pacientes IMSI. En los 565 restantes, la selección se realizó con una microscopía de contraste por modulación de Hoffman, formando el grupo de pacientes ICSI. Mediante un estudio estadístico se realizó una comparación de las características y resultados clínicos de ambos grupos.

Posteriormente, se establecieron tres **grupos de estudio** por procedencia de muestra:

1. El grupo de muestras de semen homólogo obtenidas el mismo día de la microinyección (grupo de muestras en fresco, n=376).
2. El grupo de muestras de semen homólogo criopreservadas antes del día de la microinyección (grupo de muestras congeladas, n=802).
3. El grupo en el que la microinyección se realizó con semen de donante (grupo de semen de donante, n=321).

Mediante un análisis estadístico se realizó un estudio comparativo de las características y resultados clínicos de cada grupo, en función del tipo de técnica usada para realizar la microinyección (IMSI o ICSI).

Dentro de las muestras homólogas, también se tuvo en cuenta el diagnóstico de la teratozoospermia, y el del factor masculino severo como es la oligoastenoteratozoospermia (OAT). Por lo que, se formaron varios **subgrupos de estudio**:

1. Subgrupo de muestras en fresco con teratozoospermia (n=295).
2. Subgrupo de muestras en fresco OAT (n=188).
3. Subgrupo de muestras congeladas con teratozoospermia (n=474).
4. Subgrupo de muestras congeladas con OAT (n=150).

Mediante un análisis estadístico se realizó un estudio comparativo de las características y resultados clínicos de los subgrupos en función del tipo de técnica usada para realizar la microinyección (IMSI o ICSI).

Finalmente, los pacientes con un índice de fragmentación del ADN espermático (IF) conocido (n=213), también fueron objeto de estudio. En función de la procedencia de muestra se establecieron dos **subgrupos de estudio**:

1. El subgrupo de muestras en fresco con un perfil de su IF (n=132).
2. El subgrupo de muestras congeladas con un perfil de su IF(n=81).

Mediante un análisis estadístico se realizó un estudio comparativo de las características y resultados clínicos de ambos subgrupos en función del tipo de técnica usada para realizar la microinyección (IMSI o ICSI).

17. ESTUDIO ESTADÍSTICO.

El estudio estadístico se llevó a cabo usando el SPSS para Windows Versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). En las variables continuas, que se presentaron mediante el valor MEDIO \pm desviación típica, se incluyeron parámetros seminales (volumen, concentración, movilidad, formas normales y fragmentación de ADN), nº de ciclos, óvulos inseminados, número de embriones totales, porcentaje de embriones A+B, número de embriones transferidos, tasa de fecundación y tasa de implantación. La comparación de las distintas variables continuas entre grupos y/o subgrupos se hizo mediante un contraste de medias utilizando el test T de Student.

Las variables discretas, donde se incluyeron tipo de muestras utilizadas entre técnicas (eyaculado fresco, eyaculado congelado y semen de donante), la gestación clínica, el aborto y el embarazo a término, fueron expresadas en porcentaje. El análisis de estas variables se realizó mediante comparación de proporciones o χ^2 de Pearson o el test exacto de Fisher.

Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

Todos los resultados fueron calculados por transferencia realizada y siguiendo la recomendación de Zegers-Hochschild y colaboradores [75]. La tasa de fecundación

se calculó considerando el número de óvulos fecundados correctamente, respecto del total de los óvulos inseminados. El porcentaje de embriones de calidad A+B, se calculó respecto al número de embriones totales viables en día 3 de desarrollo. La tasa de implantación se calculó considerando el número total de SG respecto al número total de embriones transferidos. El porcentaje de gestación clínica se calculó considerando la visualización de LCF respecto al total de transferencias realizadas. El porcentaje de embarazo a término según el número de nacidos vivos respecto al total de transferencias ejecutadas. Y finalmente, el porcentaje de aborto se calculó teniendo en cuenta todos los SG, incluyéndose los embarazos ectópicos e interrupciones voluntarias (IVE), que no llegaron a término.

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS LLEVADOS A ESTUDIO.

Se describieron las características generales de los 1499 pacientes que fueron seleccionados para estudio, (**Tabla 1**). En 934 (62.3%) pacientes, la selección de los espermatozoides previa a la microinyección se realizó mediante microscopía de contraste por interferencia diferencial de Nomarski, formando el grupo de pacientes IMSI. En los 565 (37.7%) restantes, la selección se realizó con una microscopía de contraste por modulación de Hoffman, formando el grupo de pacientes ICSI.

Las muestras utilizadas para la microinyección espermática fueron 376 (25.1%) eyaculados en fresco, 802 (53.5%) muestras congeladas y 321 (21.4%) muestras de semen de donante.

A todas las muestras de semen homólogo (n=1178) se les realizó un seminograma previo al día de la punción, encontrándonos con unas características basales del semen de 3.43 ± 1.97 de volumen (ml), 35.39 ± 23.97 de concentración (millones/ml), 41.33 ± 13.59 de movilidad tipo A+B, y 24.33 ± 7.64 de formas normales.

Con el resultado del seminograma las muestras fueron diagnosticadas, según los criterios de OMS [43, 74], como Normozoospermicas (N), 150 (12.7%); Astenozoospermicas (A), 257 (21.8%); Astenoteratozoospermicas (AT), 436 (37%); Oligoastenozoospermicas (OA), 3 (0.2%); Teratozoospermicas (T) ,14 (1.1%); y Oligoastenoteratozoospermicas (OAT), 318 (27%).

La fragmentación del ADN espermático se realizó en 213 pacientes. La distribución del IF fue de 21.63 ± 9.03 . En 183 pacientes el IF fue menor del 30% (18.86 ± 5.89), y en 30 pacientes fue mayor o igual al 30% (38.50 ± 5.95).

El número de ciclos realizado por paciente fue de 1.23 ± 0.51 . Se desglosó el número de ciclos realizados, y 1212 pacientes (80.9%) realizó su primer ciclo, 236 (15.7%) el segundo, 42 (2.8%) el tercero y 8 (0.5%) su cuarto ciclo. Se microinyectaron

Resultados

12.30 ± 3.02 óvulos por pacientes. La tasa de fecundación fue de 64.40 ± 17.55. El número total de embriones por paciente fue de 5.80 ± 2.50 y de estos 53.76 ± 25.48 fueron embriones de categorías A+B. Se transfirieron una media de 1.92 ± 0.27 embriones. La tasa de implantación fue de 26.68 ± 36.33. La gestación clínica se visualizó en 545 (36.4%) pacientes. Hubo 481(32.1%) embarazos a término. Y se registraron 111 (7.4%) abortos.

2. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TÉCNICAS: IMSI E ICSI

Se compararon las características generales del grupo en función de la técnica, IMSI (n=934) o ICSI (n=565). En relación a las muestras seminales, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.001$) en cuanto al tipo de muestra utilizada para la microinyección entre ambos grupos: eyaculado fresco (IMSI: 28.4%; ICSI: 19.6%), eyaculado congelado (IMSI: 56.9%; ICSI: 48.0%), y semen de donante (IMSI: 14.8%; ICSI: 32.4%), (**Tabla 2**).

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las características basales del semen homólogo (n=1178) utilizado entre técnicas: volumen (ml) (IMSI: 3.51 ± 2.13; ICSI: 3.25 ± 1.5), concentración (millones/ml) (IMSI: 34.71 ± 23.63; ICSI: 36.80 ± 24.66), movilidad espermática tipo A+B: (IMSI: 41.12 ± 13.70; ICSI: 41.77 ± 13.37), ni en el porcentaje de formas normales: (IMSI: 24.04 ± 7.56 ; ICSI: 24.94 ± 7.78), (**Tabla 3**).

En 213 pacientes se realizó la prueba de la fragmentación espermática. Se observaron diferencias significativas ($p=0.01$) en el porcentaje de fragmentación (IF) del ADN espermático entre grupos (IMSI: 23.23 ± 8.73; ICSI: 20.26 ± 9.09). Sin embargo, cuando el IF fue mayor o igual al 30% no hubo diferencias significativas ($p=0.74$), (IMSI: 38.13 ± 6.47; ICSI: 38.87 ± 5.59), (**Tabla 4**).

Tabla 1. Características generales de la población de estudio.

TÉCNICA	
IMSI	934 (62.3%)
ICSI	565 (37.7%)
TIPO DE MUESTRA SEMINAL	
Eyaculado Fresco	376 (25.1%)
Eyaculado Congelado	802 (53.5%)
Semen de Donante	321 (21.4%)
CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DEL SEMINOGRAMA (N=1178)	
Volumen (ml)	3.43 ± 1.97
Concentración (millones/ml)	35.39 ± 23.97
Movilidad (A+B)	41.33 ± 13.59
% Formas normales	24.33 ± 7.64
DIAGNÓSTICO DE LAS MUESTRAS (N=1178)	
Normozoospermicas (N)	150 (12.7%)
Astenozoospermicas (A)	257 (21.8%)
Astenoteratozoospermicas (AT)	436 (37.0%)
Oligoastenozoospermicas (OA)	3 (0.2%)
Teratozoospermicas (T)	14 (1.1%)
Oligoastenoteratozoospermicas (OAT)	318 (27%)
IF ESPERMÁTICO (N=213)	
<30%(n=183)	18.86 ± 5.89
≥ 30% (n=30)	38.50 ± 5.95

Resultados

Nº DE CICLO CICLOS REALIZADOS	1.23 ± 0.51
Primer Ciclo	1212 (80.9%)
Segundo Ciclo	236 (15.7%)
Tercer ciclo	42 (2.8%)
Cuatro ciclo	8 (0.5%)
ÓVULOS INSEMINADOS	12.30 ± 3.02
Nº TOTAL DE EMBRIONES	5.80 ± 2.50
% DE EMBRIONES A+B	53.76 ± 25.48
EMBRIONES TRANSFERIDOS	1.92 ± 0.27
TASA DE FECUNDACIÓN	64.40 ± 17.55
TASA DE IMPLANTACIÓN	26.68 ± 36.33
GESTACIÓN CLÍNICA	545 (36.4%)
ABORTO	111 (7.4%)
EMBARAZO A TÉRMINO	481 (32.1%)

Variables continuas expresadas en valor MEDIO ± desviación típica. Variables discretas expresadas en porcentajes (n).IF (índice de fragmentación)

Se compararon las características del ciclo de fecundación *in vitro*, no hubo diferencias significativas en cuanto al números de ciclo realizados por paciente (IMSI: 1.23 ± 0.50; ICSI: 1.23 ± 0.53), y ni en el número de embriones totales (IMSI: 5.84 ± 2.5; ICSI: 5.72 ± 2.4).

Si se encontraron diferencias en el número de óvulos inseminados (IMSI: 12.48 ± 3.06; ICSI: 12.00 ± 2.94) (p=0.003), en el porcentaje de embriones tipo A+B (IMSI: 52.42 ± 25.3; ICSI: 55.99 ± 25.60) (p=0.008) y en el número de embriones transferidos (IMSI: 1.94 ± 0.24; ICSI: 1.90 ± 0.31) (p=0.005). Pero, no se encontraron diferencias

significativas en los resultados finales del ciclo: tasa de fecundación (IMSI: 64.52 ± 17.14 ; ICSI: 64.21 ± 18.21), tasa de implantación (IMSI: 26.87 ± 36.60 ; ICSI: 26.37 ± 35.90), gestación clínica (IMSI: 36.4%; ICSI: 36.3%), aborto (IMSI: 8.1%; ICSI: 6.2%), y embarazo a término (IMSI: 31.6%; ICSI: 32.9%), (**Tabla 5**).

Tabla 2. Estudio comparativo entre las muestras utilizadas entre técnicas: IMSI E ICSI.

	IMSI (n= 934)	ICSI (n= 565)	P
EYACULADO FRESCO (n=376)	265 (28.4%)	111 (19.6%)	<0.001
EYACULADO CONGELADO (n=802)	531 (56.9%)	271 (48.0%)	0.001
SEMEN DONANTE (n=321)	138 (14.8%)	183 (32.4%)	<0.001

Variables discretas expresadas en porcentajes (n)

Tabla 3. Estudio comparativo entre las características basales del semen homólogo entre técnicas: IMSI e ICSI.

	IMSI (n= 796)	ICSI (n= 382)	P
VOLUMEN (ml)	3.51 ± 2.13	3.25 ± 1.5	0.40
CONCENTRACIÓN (millones/ml)	34.71 ± 23.63	36.80 ± 24.66	0.16
MOVILIDAD A+B	41.12 ± 13.70	41.77 ± 13.37	0.44
% FORMAS NORMALES	24.04 ± 7.56	24.94 ± 7.78	0.59

Variables continuas expresadas en valor MEDIO \pm desviación típica

Se establecieron tres grupos por procedencia de muestra para comparar ambas técnicas, IMSI e ICSI: El grupo de las muestras en fresco, el grupo de las muestras congeladas y el grupo de las muestras de semen de donante.

Resultados

Tabla 4. Características del índice de fragmentación del ADN espermático entre técnicas: IMSI e ICSI.

FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO		
IMSI (n=98)		23.23 ± 8.73 ^a
ICSI (n=115)		20.26 ± 9.09 ^b
IF del ADN ≥30	IMSI (n=15)	38.13 ± 6.47*
	ICSI (n=15)	38.87 ± 5.59*

Diferentes superíndices (a y b) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el índice de fragmentación (IF) entre técnicas. IF expresado en porcentaje.

El IF del ADN ≥30 no mostró diferencias significativas entre grupos (* $p = 0.74$). IF expresado en porcentaje.

Tabla 5. Estudio comparativo de las características y resultados de los ciclos entre IMSI e ICSI.

	IMSI=934	ICSI=565	P
Nº CICLO	1.23 ± 0.50	1.23 ± 0.53	0.89
INSEMINADOS	12.48 ± 3.06	12.00 ± 2.94	0.003
EMBRIONES TOTALES	5.84 ± 2.5	5.72 ± 2.4	0.39
EMBRIONES A+B (%)	52.42 ± 25.3	55.99 ± 25.60	0.008
EMBRIONES TRANSFERIDOS	1.94 ± 0.24	1.90 ± 0.31	0.005
TASA DE FECUNDACIÓN	64.52 ± 17.14	64.21 ± 18.21	0.73
TASA DE IMPLANTACIÓN	26.87 ± 36.60	26.37 ± 35.90	0.79
GESTACIÓN CLÍNICA	36.4	36.3	0.96
ABORTO	8.1	6.2	0.16
EMBARAZO A TÉRMINO	31.6	32.9	0.59

Variables continuas expresadas en valor MEDIO ± desviación típica. Variables discretas expresadas en porcentajes(n). Se consideran diferencias significativas entre columnas si $p < 0.05$

3. GRUPO DE MUESTRAS EN FRESCO: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE IMSI E ICSI.

Los grupos de estudio estuvieron formados por los pacientes que recogieron la muestra espermática el mismo día de la microinyección:

1. 265 ciclos de IMSI.
2. 111 ciclos de ICSI.

La única diferencia significativa, ($p=0.01$), encontrada entre el grupo de IMSI y el de ICSI fue el grado de teratozoospermia de la muestra el día del seminograma. El grado de teratozoospermia se expresó por el porcentaje de formas normales (IMSI: 20.41 ± 7.75 ; ICSI: 22.80 ± 9.16).

No hubo diferencias con el resto de parámetros seminales: volumen (ml) (IMSI: 3.56 ± 2.05 ; ICSI: 3.15 ± 1.57), concentración (millones/ml) (IMSI: 27.78 ± 24.85 ; ICSI: 29.74 ± 22.60), y movilidad espermática tipo A+B: (IMSI: 34.94 ± 15.00 ; ICSI: 37.50 ± 15.25).

Tampoco se encontraron diferencias significativas comparando el resto de características del ciclo y los resultados finales: número de ciclos (IMSI: 1.31 ± 0.56 ; ICSI: 1.32 ± 0.61); óvulos inseminados (IMSI: 12.87 ± 2.97 ; ICSI: 12.56 ± 3.05), número de embriones totales (IMSI: 5.96 ± 2.56 ; ICSI: 5.96 ± 2.42), porcentaje de embriones tipo A+B (IMSI: 52.66 ± 25.87 ; ICSI: 56.50 ± 25.12), embriones transferidos (IMSI: 1.94 ± 0.23 ; ICSI: 1.92 ± 0.27), tasa de fecundación (IMSI: 62.97 ± 17.48 ; ICSI: 62.08 ± 17.86), tasa de implantación (IMSI: 26.98 ± 35.86 ; ICSI: 29.72 ± 35.91), gestación clínica (IMSI: 38.1% ; ICSI: 40.5%), aborto (IMSI: 7.9%; ICSI: 10.8%) y embarazo a término (IMSI: 32.8%; ICSI: 35.1%), (**Tabla 6**).

3.1. Subgrupo de muestras en fresco teratozoospermicas: estudio comparativo entre IMSI e ICSI

De los pacientes que recogieron la muestra el mismo día de la microinyección, 295 habían sido diagnosticados con teratozoospermia el día del seminograma. En 224 casos se realizó IMSI y en 71 ICSI, formando dos subgrupos de estudios dentro de las muestras en fresco:

1. IMSI con eyaculado fresco con teratozoospermia (n=224).
2. ICSI con eyaculado fresco con teratozoospermia (n=71).

No se encontraron diferencias significativas entre técnicas en ninguno de los parámetros seminales (volumen, concentración, movilidad y porcentaje de formas normales), ni en las características del ciclo (número de ciclo, óvulos inseminados, embriones totales, porcentaje de embriones de tipo A+B y embriones transferidos).

Tampoco hubo diferencias significativas en los resultados finales: tasa de fecundación (IMSI: 63.07 ± 17.25 ; ICSI: 61.05 ± 18.08), tasa de implantación (IMSI: 27.00 ± 35.69 ; ICSI: 28.16 ± 36.57), gestación clínica (IMSI: 38.4%; ICSI: 36.6%), aborto (IMSI: 8.5%; ICSI: 8,5%), y embarazo a término (IMSI: 32.6%; ICSI: 33.8%), **(Tabla 7).**

3.2. Subgrupo de muestras en fresco con factor masculino severo (OAT): estudio comparativo entre IMSI e ICSI

De los pacientes que recogieron la muestra el mismo día de la microinyección, 168 fueron diagnosticados, el día del seminograma, con oligoastenoteratozoospermia (OAT). En 124 casos se realizó IMSI y en 44 ICSI; formando dos subgrupos de estudio dentro de las muestras en fresco:

1. IMSI con eyaculado fresco con oligoastenoteratozoospermia (n=124).

2. ICSI con eyaculado fresco con oligoastenoteratozoospermia (n=44).

No se encontraron diferencias significativas entre grupos en ninguno de los parámetros seminales (volumen, concentración, movilidad y porcentaje de formas normales), ni en las características del ciclo (número de ciclo, óvulos inseminados, embriones totales, porcentaje de embriones de tipo A+B y embriones transferidos).

Tampoco hubo diferencias significativas en los resultados finales: tasa de fecundación (IMSI: 60.26 ± 18.00 ; ICSI: 61.63 ± 18.66), tasa de implantación (IMSI: 26.61 ± 35.74 ; ICSI: 28.40 ± 36.40), gestación clínica (IMSI: 39.5%; ICSI: 38.6%), aborto (IMSI: 4 %; ICSI: 9.1 %) y embarazo a término (IMSI: 35.5%; ICSI: 34.1%), **(Tabla 8).**

3.3. Subgrupo de muestras en fresco con un perfil de la fragmentación del ADN espermático: estudio comparativo entre IMSI e ICSI

La prueba de fragmentación espermática se había realizado a 132 pacientes que recogieron el eyaculado el día de la microinyección, en 77 se realizó IMSI y en 55 ICSI, formando dos subgrupos de estudio:

1. IMSI con eyaculado fresco y con IF (n=77).
2. ICSI con eyaculado fresco y con IF (n=55).

Se encontraron diferencias significativas entre grupos en el porcentaje de fragmentación del ADN espermático (IF) (IMSI: 24.36 ± 7.84 ; ICSI: 19.98 ± 9.06) ($p=0.04$) y en el número de óvulos inseminados (IMSI: 13.45 ± 2.85 ; ICSI: 12.15 ± 3.2) ($p=0.01$). Sin embargo, el IF igual o superior al 30% no fue significativo entre grupos (IMSI: 37.82 ± 6.80 ; ICSI: 38.43 ± 6.77), **(Tabla 9).**

Resultados

Tabla 6. Características y resultados de los ciclos con muestras en fresco: estudio comparativo entre IMSI e ICSI.

	IMSI=265	ICSI=111	P
PARÁMETROS SEMINALES			
Volumen (ml)	3.56 ± 2.05	3.15 ± 1.57	0.06
Concentración (millones/ml)	27.78 ± 24.85	29.74 ± 22.60	0.45
Movilidad (A+B)	34.94 ± 15.00	37.50 ± 15.25	0.13
% Formas normales	20.41 ± 7.75	22.80 ± 9.16	0.01
Nº CICLO	1.31 ± 0.56	1.32 ± 0.61	0.92
INSEMINADOS	12.87 ± 2.97	12.56 ± 3.05	0.35
EMBRIONES TOTALES	5.96 ± 2.56	5.96 ± 2.42	0.99
EMBRIONES A+B (%)	52.66 ± 25.87	56.50 ± 25.12	0.18
EMBRIONES TRANSFERIDOS	1.94 ± 0.23	1.92 ± 0.27	0.48
TASA DE FECUNDACIÓN	62.97 ± 17.48	62.08 ± 17.86	0.65
TASA DE IMPLANTACIÓN	26.98 ± 35.86	29.72 ± 35.91	0.49
GESTACIÓN CLÍNICA	38.1	40.5	0.66
ABORTO	7.9	10.8	0.36
EMBARAZO A TÉRMINO	32.8	35.1	0.66

Variables continuas expresadas en valor MEDIO ± desviación típica. Variables discretas expresadas en porcentajes(n). Se consideran diferencias significativas entre columnas si $p < 0.05$

No hubo diferencias significativas entre grupos en el resto de parámetros seminales (volumen, concentración, movilidad y porcentaje de formas normales), ni en el resto de características del ciclo (número de ciclo, embriones totales, porcentaje de embriones de tipo A+B y embriones transferidos). Tampoco hubo diferencias significativas en los resultados finales: tasa de fecundación (IMSI: 66.28 ± 13.20; ICSI: 61.41 ± 18.66), tasa de implantación (IMSI: 23.37 ± 34.01; ICSI: 21.81 ± 28.48),

gestación clínica (IMSI: 35.1%; ICSI: 38.2%), aborto (IMSI: 9.1%; ICSI: 10.9%) y embarazo a término (IMSI: 27.3%; ICSI: 29.1%). Se observó una tendencia a mejor tasa de fecundación en el grupo de IMSI, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas ($p=0.08$), (**Tabla 9**).

Tabla 7. Características y resultados de los ciclos con muestras en fresco teratozoospermicas: estudio comparativo entre IMSI e ICSI.

	IMSI=224	ICSI=71	P
PARÁMETROS SEMINALES			
Volumen (ml)	3.60 ± 2.13	3.31 ± 1.61	0.28
Concentración (millones/mil)	22.54 ± 18.56	18.53 ± 16.57	0.10
Movilidad (% A+B)	32.21 ± 14.05	30.94 ± 13.44	0.50
% Formas normales	18.05 ± 5.68	16.93 ± 5.47	0.14
Nº CICLO	1.29 ± 0.51	1.18 ± 0.42	0.13
INSEMINADOS	12.91 ± 3.05	12.85 ± 3.12	0.87
EMBRIONES TOTALES	5.97 ± 2.60	6.06 ± 2.52	0.80
EMBRIONES A+B (%)	52.34 ± 25.99	53.96 ± 24.14	0.62
EMBRIONES TRANSFERIDOS	1.94 ± 0.24	1.89 ± 0.31	0.16
TASA DE FECUNDACIÓN	63.07 ± 17.25	61.05 ± 18.08	0.41
TASA DE IMPLANTACIÓN	27.00 ± 35.69	28.16 ± 36.57	0.81
GESTACIÓN CLÍNICA	38.4	36.6	0.78
ABORTO	8.5	8.5	0.99
EMBARAZO A TÉRMINO	32.6	33.8	0.85

Variables continuas expresadas en valor MEDIO ± desviación típica. Variables discretas expresadas en porcentajes(n). Se consideran diferencias significativas entre columnas si $p<0.05$

Resultados

Tabla 8. Características y resultados de los ciclos con muestras en fresco OAT: estudio comparativo entre IMSI e ICSI.

	IMSI=124	ICSI=44	P
PARÁMETROS SEMINALES			
Volumen (ml)	3.80 ± 2.42	3.35 ± 1.55	0.25
Concentración (millones/mil)	10.36 ± 12.17	8.44 ± 5.01	0.31
Movilidad (% A+B)	26.96 ± 12.84	26.41 ± 13.73	0.80
% Formas normales	15.61 ± 5.20	15.36 ± 5.49	0.78
Nº CICLO	1.22 ± 0.45	1.20 ± 0.40	0.86
INSEMINADOS	12.90 ± 3.08	12.93 ± 2.84	0.94
EMBRIONES TOTALES	5.80 ± 2.53	6.00 ± 2.28	0.64
EMBRIONES A+B (%)	51.03 ± 26.21	51.39 ± 24.12	0.93
EMBRIONES TRANSFERIDOS	1.94 ± 0.23	1.89 ± 0.32	0.20
TASA DE FECUNDACIÓN	60.26 ± 18.00	61.63 ± 18.66	0.66
TASA DE IMPLANTACIÓN	26.61 ± 35.74	28.40 ± 36.40	0.77
GESTACIÓN CLÍNICA	39.5	38.6	0.91
ABORTO	4.0	9.1	0.24
EMBARAZO A TERMINO	35.5	34.1	0.86

Variables continuas expresadas en valor MEDIO ± desviación típica. Variables discretas expresadas en porcentajes(n). Se consideran diferencias significativas entre columnas si p<0.05

Tabla 9. Características y resultados de los ciclos con muestras en fresco con IF del ADN espermático: estudio comparativo entre IMSI e ICSI

	IMSI=77	ICSI=55	P
PARÁMETROS SEMINALES			
Volumen (ml)	3.44 ± 1.71	3.25 ± 1.50	0.50
Concentración (millones/mil)	35.49 ± 30.43	32.55 ± 21.86	0.54
Movilidad (% A+B)	40.45 ± 12.95	41.36 ± 13.31	0.69
% Formas normales	23.71 ± 7.51	24.53 ± 8.84	0.57
FRAGMENTACIÓN (IF) (%)	24.36 ± 7.84	19.98 ± 9.06	0.04
IF del ADN ≥ 30% (%)	(n=11) 37.82 ± 6.80	(n=7) 38.43 ± 6.77	0.85
Nº CICLO	1.39 ± 0.67	1.45 ± 0.68	0.58
INSEMINADOS	13.45 ± 2.85	12.15 ± 3.2	0.01
EMBRIONES A+B (%)	53.72 ± 25.14	58.12 ± 27.02	0.33
EMBRIONES TRANSFERIDOS	1.95 ± 0.22	1.96 ± 0.18	0.67
TASA DE FECUNDACIÓN	66.28 ± 13.20	61.41 ± 18.66	0.08
TASA DE IMPLANTACIÓN	23.37 ± 34.01	21.81 ± 28.48	0.78
GESTACIÓN CLÍNICA	35.1	38.2	0.72
ABORTO	9.1	10.9	0.73
EMBARAZO A TERMINO	27.3	29.1	0.81

Variables continuas expresadas en valor MEDIO ± desviación típica. Variables discretas expresadas en porcentajes(n). Se consideran diferencias significativas entre columnas si $p < 0.05$. IF (índice de fragmentación)

4. GRUPO DE MUESTRAS CONGELADAS: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE IMSI E ICSI

La microinyección se realizó en 802 ciclos con muestras previamente criopreservadas. Se formaron dos grupos según la técnica de selección espermática:

1. 531 ciclos de IMSI con muestra congelada.
2. 271 ciclos ICSI con muestras congeladas.

La única diferencia significativa entre grupos fue el número de ciclos realizados (IMSI: 1.15 ± 0.39 ; ICSI: 1.05 ± 0.21) ($p < 0.001$) y el porcentaje de embriones A+B (IMSI: 52.52 ± 25.74 ; ICSI: 56.49 ± 26.42) ($p = 0.04$).

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros seminales estudiados: volumen (ml) (IMSI: 3.48 ± 2.16 ; ICSI: 3.30 ± 1.59), concentración (millones/ml) (IMSI: 38.18 ± 22.22 ; ICSI: 39.69 ± 24.92), movilidad espermática tipo A+B: (IMSI: 44.21 ± 11.86 ; ICSI: 43.52 ± 12.12) y porcentaje de formas normales (IMSI: 25.85 ± 6.78 ; ICSI: 25.81 ± 6.97).

Tampoco se encontraron diferencias significativas comparando el resto de características del ciclo y los resultados finales: óvulos inseminados (IMSI: 12.45 ± 3.13 ; ICSI: 11.96 ± 2.97), número de embriones totales (IMSI: 5.73 ± 2.55 ; ICSI: 5.61 ± 2.59), embriones transferidos (IMSI: 1.94 ± 0.23 ; ICSI: 1.90 ± 0.30), tasa de fecundación (IMSI: 64.21 ± 17.01 ; ICSI: 64.01 ± 18.43), tasa de implantación (IMSI: 27.02 ± 36.84 ; ICSI: 26.01 ± 36.72), gestación clínica (IMSI: 36.2% ; ICSI: 34.3%), aborto (IMSI 8.1%; ICSI: 5.5%), y embarazo a término (IMSI: 31.6 %; ICSI: 31.4 %). Se observó una tendencia en el número de embriones transferidos en el grupo de IMSI, pero las diferencias no llegaron a ser significativas ($p = 0.07$), (**Tabla 10**).

4.1. Subgrupo de muestras congeladas teratozoospermicas: estudio comparativo entre IMSI e ICSI.

De todas las muestras congeladas, 474 presentaron teratozoospermia el día del seminograma, 314 se descongelaron para realizar IMSI y 160 para realizar ICSI. De esta manera, se establecieron dos subgrupos de estudio:

1. IMSI con muestras congeladas con teratozoospermia (n=314).
2. ICSI con muestras congeladas con teratozoospermia (n=160).

Se encontraron diferencias significativas entre grupos en el número de ciclo realizado (IMSI: 1.12 ± 0.35 ; ICSI: 1.03 ± 0.17) ($p=0.03$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los parámetros seminales (volumen, concentración, movilidad y porcentaje de formas normales), ni en el resto de las características del ciclo (óvulos inseminados, embriones totales, porcentaje de embriones de tipo A+B y embriones transferidos).

Tampoco hubo diferencias significativas en los resultados finales: tasa de fecundación (IMSI: 64.92 ± 16.96 ; ICSI: 61.99 ± 18.52), tasa de implantación (IMSI: 25.47 ± 35.12 ; ICSI: 21.25 ± 33.90), gestación clínica (IMSI: 34.7%; ICSI: 28.1%), aborto (IMSI: 8.9%; ICSI: 5%) y embarazo a término (IMSI: 29.9%; ICSI: 25.6%). Se observó una tendencia a mejor tasa de fecundación en el grupo de IMSI, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas ($p=0.08$), (**Tabla 11**).

4.2. Subgrupo de muestras congeladas con factor masculino severo (OAT): estudio comparativo entre IMSI e ICSI

Se congelaron 150 muestras diagnosticadas con oligoastenoteratozoospermia (OAT). El día de la microinyección se descongelaron 91 muestras OAT para realizar IMSI, y 59 para realizar ICSI. Se establecieron dos subgrupos de estudio:

1. IMSI con muestras congeladas con OAT (n=91).

2. ICSI en muestras congeladas con OAT (n=59).

No se encontraron diferencias significativas entre en ninguno de los parámetros seminales (volumen, concentración, movilidad y porcentaje de formas normales), ni en las características del ciclo (número de ciclo, óvulos inseminados, embriones totales, porcentaje de embriones de tipo A+B y embriones transferidos). Tampoco hubo diferencias significativas en la tasa de fecundación (IMSI: 61.91 ± 16.60 ; ICSI: 63.20 ± 19.27), ni en el porcentaje de aborto (IMSI: 6.6%; ICSI: 6.8%).

Si se encontraron diferencias significativas entre grupos en la tasa de implantación (IMSI: 26.37 ± 36.00 ; ICSI: 14.40 ± 29.43) ($p=0.03$), gestación clínica (IMSI: 38.5%; ICSI: 15.3%) ($p=0.002$), y embarazo a término (IMSI: 33%; ICSI: 13.6%) ($p=0.008$), (**Tabla 12**).

4.3. Subgrupo de muestras congeladas con un perfil de fragmentación del ADN espermático: estudio comparativo entre IMSI e ICSI

La prueba de fragmentación espermática se había realizado a 81 pacientes que congelaron la muestra antes del día de la microinyección. En 21 casos se descongeló la muestra para realizar IMSI y en 60 para realizar ICSI. Se establecieron dos subgrupos de estudio:

1. IMSI con muestras congeladas y IF (n=21).

2. ICSI con muestras congeladas y IF (n=60).

No se encontraron diferencias significativas entre grupos ni en los parámetros seminales estudiados (volumen, concentración, movilidad, porcentaje de formas normales y porcentaje de fragmentación del DNA espermático (IF)), ni en ciertas características del ciclo (número de óvulos inseminados, número de embriones totales, porcentaje de embriones de tipo A+B y embriones transferidos). Tampoco

hubo diferencias entre grupos en las tasas de fecundación (IMSI: 61.40 ± 21.79 ; ICSI: 60.83 ± 17.39), (Tabla 13).

Tabla 10. Características y resultados de los ciclos con muestras congeladas: estudio comparativo entre IMSI e ICSI

	IMSI=531	ICSI=271	P
PARÁMETROS SEMINALES			
Volumen (ml)	3.48 ± 2.16	3.30 ± 1.59	0.22
Concentración (millones/mil)	38.18 ± 22.22	39.69 ± 24.92	0.38
Movilidad (% A+B)	44.21 ± 11.86	43.52 ± 12.12	0.44
% Formas normales	25.85 ± 6.78	25.81 ± 6.97	0.94
Nº CICLO	1.15 ± 0.39	1.05 ± 0.21	<0.001
INSEMINADOS	12.45 ± 3.13	11.96 ± 2.97	0.35
FECUNDADOS	7.96 ± 2.76	7.70 ± 3.04	0.22
EMBRIONES TOTALES	5.73 ± 2.55	5.61 ± 2.59	0.54
EMBRIONES A+B (%)	52.52 ± 25.74	56.49 ± 26.42	0.04
EMBRIONES TRANSFERIDOS	1.94 ± 0.23	1.90 ± 0.30	0.07
TASA DE FECUNDACIÓN	64.21 ± 17.01	64.01 ± 18.43	0.87
TASA DE IMPLANTACIÓN	27.02 ± 36.84	26.01 ± 36.72	0.71
GESTACIÓN CLÍNICA	36.2	34.3	0.60
ABORTO	8.1	5.5	0.18
EMBARAZO A TÉRMINO	31.6	31.4	0.93

Variables continuas expresadas en valor MEDIO \pm desviación típica. Variables discretas expresadas en porcentajes(n). Se consideran diferencias significativas entre columnas si $p < 0.05$

Se encontraron diferencias significativas entre grupos en el número de ciclo realizado (IMSI: 1.38 ± 0.59 ; ICSI: 1.07 ± 0.25) ($p=0.001$), tasa de implantación (IMSI:

Resultados

33.3 ± 32.91; ICSI: 8.3 ± 24.64) (p<0.001), gestación clínica (IMSI: 57.1%; ICSI: 10%) (p<0.001), aborto (IMSI: 33.3%; ICSI: 5%) (p=0.001) y embarazo a término (IMSI: 23.8%; ICSI: 6.7%) (p=0.03), (Tabla 13).

Tabla 11. Características y resultados de los ciclos con muestras congeladas teratozoospermicas: estudio comparativo entre IMSI e ICSI.

	IMSI=314	ICSI=160	P
PARÁMETROS SEMINALES			
Volumen (ml)	3.60 ± 2.48	3.31 ± 1.52	0.16
Concentración (millones/mil)	30.31 ± 20.69	27.65 ± 16.19	0.15
Movilidad (% A+B)	37.88 ± 10.06	38.00 ± 10.58	0.90
% Formas normales	21.07 ± 3.85	20.82 ± 3.89	0.50
Nº CICLO	1.12 ± 0.35	1.03 ± 0.17	0.03
INSEMINADOS	12.46 ± 3.14	12.15 ± 3.05	0.30
FECUNDADOS	8.07 ± 2.82	7.59 ± 3.08	0.09
EMBRIONES TOTALES	5.78 ± 2.57	5.54 ± 2.63	0.34
EMBRIONES A+B (%)	52.19 ± 25.75	55.74 ± 26.79	0.16
EMBRIONES TRANSFERIDOS	1.93 ± 0.25	1.90 ± 0.32	0.21
TASA DE FECUNDACIÓN	64.92 ± 16.96	61.99 ± 18.52	0.08
TASA DE IMPLANTACIÓN	25.47 ± 35.12	21.25 ± 33.90	0.21
GESTACIÓN CLÍNICA	34.7	28.1	0.14
ABORTO	8.9	5.0	0.12
EMBARAZO A TÉRMINO	29.9	25.6	0.32

Variables continuas expresadas en valor MEDIO ± desviación típica. Variables discretas expresadas en porcentajes(n). Se consideran diferencias significativas entre columnas si p<0.05

Tabla 12. Características y resultados de los ciclos con muestras congeladas OAT: estudio comparativo entre IMSI e ICSI.

	IMSI=91	ICSI=59	P
PARÁMETROS SEMINALES			
Volumen (ml)	4.23 ± 3.88	3.50 ± 1.59	0.17
Concentración (millones/mil)	13.27 ± 4.12	12.92 ± 5.54	0.65
Movilidad (% A+B)	34.78 ± 9.51	35.08 ± 10.02	0.85
% Formas normales	19.08 ± 4.12	18.88 ± 3.93	0.77
Nº CICLO	1.12 ± 0.36	1.05 ± 0.22	0.18
INSEMINADOS	12.44 ± 3.45	12.02 ± 3.02	0.44
FECUNDADOS	7.62 ± 2.72	7.56 ± 2.84	0.90
EMBRIONES TOTALES	5.42 ± 2.78	5.39 ± 2.49	0.94
EMBRIONES A+B (%)	54.86 ± 27.74	53.98 ± 30.15	0.85
EMBRIONES TRANSFERIDOS	1.92 ± 0.26	1.92 ± 0.28	0.86
TASA DE FECUNDACIÓN	61.91 ± 16.60	63.20 ± 19.27	0.66
TASA DE IMPLANTACIÓN	26.37 ± 36.00	14.40 ± 29.43	0.03
GESTACIÓN CLÍNICA	38.5	15.3	0.002
ABORTO	6.6	6.8	0.96
EMBARAZO A TÉRMINO	33.0	13.6	0.008

Variables continuas expresadas en valor MEDIO ± desviación típica. Variables discretas expresadas en porcentajes(n). Se consideran diferencias significativas entre columnas si $p < 0.05$

Resultados

Tabla 13. Características y resultados de los ciclos con muestras congeladas con IF del ADN espermático: estudio comparativo entre IMSI e ICSI

	IMSI=21	ICSI=60	P
PARÁMETROS SEMINALES			
Volumen (ml)	2.62 ± 12.28	3.19 ± 1.49	0.12
Concentración (millones/mil)	34.62 ± 13.70	40.84 ± 23.46	0.25
Movilidad (% A+B)	40.48 ± 11.28	44.25 ± 12.37	0.22
% Formas normales	24.43 ± 5.28	25.37 ± 7.42	0.59
FRAGMENTACIÓN (IF) (%)	19.10 ± 10.64	20.52 ± 9.18	0.56
IF del ADN ≥ 30 (%)	(n=4) 39.00 ± 6.32	(n=8) 39.25 ± 4.77	0.94
Nº CICLO	1.38 ± 0.59	1.07 ± 0.25	0.001
INSEMINADOS	12.19 ± 2.62	12.65 ± 3.03	0.53
EMBRIONES TOTALES	5.62 ± 2.55	5.78 ± 2.87	0.81
EMBRIONES A+B (%)	53.13 ± 27.34	57.21 ± 26.88	0.55
EMBRIONES TRANSFERIDOS	1.95 ± 0.21	1.95 ± 0.28	0.97
TASA DE FECUNDACIÓN	61.40 ± 21.79	60.83 ± 17.39	0.90
TASA DE IMPLANTACIÓN	33.3 ± 32.91	8.3 ± 24.64	<0.001
GESTACIÓN CLÍNICA	57.1	10	<0.001
ABORTO	33.3	5	0.001
EMBARAZO A TERMINO	23.8	6.7	0.03

Variables continuas expresadas en valor MEDIO ± desviación típica. Variables discretas expresadas en porcentajes(n). Se consideran diferencias significativas entre columnas si $p < 0.05$. IF (índice de fragmentación)

5. MUESTRAS DE SEMEN DE DONANTE: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE IMSI E ICSI

La microinyección con semen de donante se cometió en 321 pacientes. En 138 casos se realizó IMSI y en 183 ICSI. Se establecieron dos grupos de estudio:

1. IMSI con semen de donante (n=138).
2. ICSI con semen de donante (n=183).

Tabla 14. Características y resultados de los ciclos con semen de donante: estudio comparativo entre IMSI e ICSI

	IMSI=138	ICSI=183	P
Nº CICLO	1.38 ± 0.66	1.45 ± 0.69	0.36
INSEMINADOS	11.82 ± 2.8	11.72 ± 2.7	0.75
EMBRIONES TOTALES	6.03 ± 2.2	5.75 ± 2.3	0.28
EMBRIONES A+B (%)	51.56 ± 22.74	54.94 ± 24.74	0.21
EMBRIONES TRANSFERIDOS	1.93 ± 0.2	1.87 ± 0.33	0.12
TASA DE FECUNDACIÓN	68.69 ± 16.44	65.78 ± 18.05	0.13
TASA DE IMPLANTACIÓN	26.08 ± 37.34	24.86 ± 34.71	0.76
GESTACIÓN CLÍNICA	34.1	36.6	0.63
ABORTO	8.7	4.4	0.11
EMBARAZO A TERMINO	29.0	33.9	0.35

Variables continuas expresadas en valor MEDIO ± desviación típica. Variables discretas expresadas en porcentajes(n). Se consideran diferencias significativas entre columnas si $p < 0.05$

No se encontraron diferencias significativas entre grupos en ninguno de los parámetros comparados: número de ciclos (IMSI: 1.38 ± 0.66; ICSI: 1.45 ± 0.69), óvulos inseminados (IMSI: 11.82 ± 2.8; ICSI: 11.72 ± 2.7), número de embriones totales (IMSI: 6.03 ± 2.2; ICSI: 5.75 ± 2.3), porcentaje de embriones tipo A+B (IMSI:

Resultados

51.56 ± 22.74; ICSI: 54.94 ± 24.74), embriones transferidos (IMSI: 1.93 ± 0.2; ICSI: 1.87 ± 0.33), tasa de fecundación (IMSI: 68.69 ± 16.44; ICSI: 65.78 ± 18.05), tasa de implantación (IMSI: 26.08 ± 37.34; ICSI: 24.86 ± 34.71), gestación clínica (IMSI: 34.1% ; ICSI: 36.6%), aborto (IMSI: 8.7 %; ICSI: 4.4%) y embarazo a término (IMSI: 29 %; ICSI:33.9 %), (**Tabla 14**).

DISCUSIÓN

La necesidad de las TRA ha supuesto un avance en las investigaciones biomédicas. Sin embargo, a pesar de todos los avances que se han llevado a cabo en este tipo de técnicas, se tiende a mejorar los resultados, aunque en este punto, aún no está estabilizado como la selección espermática puede participar en dicha mejora [76].

Actualmente, las técnicas fundamentales de selección de espermatozoides se basan principalmente en la morfología por criterio subjetivo del embriólogo durante el proceso de micromanipulación [27] o bien en la auto selección de los espermatozoides durante el proceso de capacitación espermática [77]. Las dos técnicas de auto selección con la que se cuenta en los laboratorios de andrología están basadas en la viabilidad y en el movimiento espermático. Por un lado, gracias a la centrifugación por gradientes de densidad se elimina el plasma seminal y otros constituyentes del fluido seminal, dejando únicamente espermatozoides viables. Y por otro lado, el método de swim-up, basado en el desplazamiento de los espermatozoides con mejor movilidad desde el pellet al sobrenadante, recupera únicamente espermatozoides móviles. El objetivo final de estas técnicas de selección es recuperar los gametos masculinos con mayor capacidad fecundante. Pero a día de hoy, ninguna garantiza el éxito en la TRA [77].

Se ha argumentado que el óvulo es el pilar fundamental para dar lugar a un embrión, y que el espermatozoide simplemente juega un papel secundario. Se supone que el óvulo es capaz de suplir con todo el material primario (proteínas, ARN, etc.) necesario para el desarrollo [78]. Sin embargo, también se ha documentado que el espermatozoide contiene alrededor de 3000 tipos diferentes de ARN mensajeros, muchos de cuáles son los responsable de codificar distintas proteínas necesarias para el desarrollo del embrión [23]. Estos estudios ha reforzado las teorías de la existencia de dos efectos paterno en el desarrollo embrionario [79, 80]: un efecto paterno temprano implicado en el proceso de post-fecundación, visible en el estadio de pronúcleos, y un efecto tardío que sin producir alteraciones en la velocidad de

desarrollo y morfología embrionaria en estadios tempranos, haría disminuir las posibilidades de gestación.

El efecto paterno tardío se ha relacionado con menor porcentaje de embriones en estadio de blastocisto, fallos de implantación y abortos, y se explica apoyándose en la hipótesis de que la expresión del material genético paterno tiene lugar alrededor de las 72 horas post-fecundación. Con lo cual, daños en el ADN paterno provocarían que la expresión genómica se paralizase a partir del día 3 desarrollo [23].

Estos efectos paternos han sido valorados en ciclos de FIV-ICSI usando como modelo la donación de óvulos a pacientes receptoras [80, 81]. Se presupone que la edad del útero no afecta a la probabilidad de gestar. Además, se ha demostrado como el reparto de óvulos de una misma donante en mujeres de diferentes edades no muestra diferencias significativas en cuanto a las posibilidades de gestación [82]. Con lo cual, la selección de ciclos de ovodonación se planteó como la mejor opción para comprobar la hipótesis de estudio, ya que un óvulo de una mujer joven y de buena calidad nos podría permitir estudiar el efecto del gameto masculino en los resultados de un ciclo de microinyección. Sin embargo, se tuvieron que establecer ciertos criterios de exclusión en el estudio para evitar posibles factores que pudiesen condicionar nuestros resultados. De esta manera, todos los ciclos se realizaron en el mismo periodo de tiempo, bajo idénticas condiciones de selección de pacientes, estimulación ovárica, y equipo material y humano. La única diferencia dentro de los grupos o subgrupos de estudio fue el tipo de microscopía utilizado para realizar la selección de los espermatozoides destinados al proceso de microinyección.

El objetivo principal de cualquier técnica de selección de espermatozoides es obtener un número suficiente de espermatozoides viables y móviles capaces de fecundar el óvulo [77]. Pero, las características estructurales de los espermatozoides parecen jugar un papel importante en el resultado de un ciclo de microinyección

espermática [22]. Gracias a la información que conocemos de la ultrasestructuras de la célula espermática, se han desarrollado distintos tipos de metodologías para llevar a cabo una buena selección espermática [40, 41]. Por ejemplo, se ha descrito el uso de microscopios de luz polarizada para realizar la ICSI con el fin de poder visualizar la organización de las organelas de los espermatozoides, basándose en las propiedades birrefringentes de estas células [40], también se han desarrollado protocolos para la selección de células espermáticas maduras para realizar la microinyección, basándose en la selección de los espermatozoides que se unen a receptores del ácido hialurónico (ICSI fisiológica o PICSI) [41].

En nuestro caso, la selección de espermatozoides se realizó utilizando dos técnicas de microscopía de contraste, la microscopía de contraste por modulación de Hoffman para realizar una ICSI, o la de contraste de interferencia diferencial de Nomarski para realizar una IMSI. Los dos sistemas son capaces de generar imágenes parecidas, sin embargo divergen en sus capacidades resolutivas [72].

La morfología de los espermatozoides seleccionados para el proceso de microinyección, independientemente de que estos provengan de eyaculados en fresco, de muestras congeladas o de biopsia testicular, repercute en los resultados finales de un ciclo [22].

Sabemos, gracias a nuestro trabajo diario, que existen una gran cantidad de casos en los que el varón presenta unos valores en el seminograma muy por encima de lo normal, y que no se logra embarazo, y por el contrario, valores por debajo de la normalidad si lo consiguen. Por lo que el seminograma, a pesar de ser un estudio básico para orientar la infertilidad masculina, podría tener sus limitaciones. Por ejemplo, podría ser que el resultado del seminograma no representase la calidad morfológica del espermatozoide seleccionado para la microinyección espermática [15, 22].

Se encuentran datos publicados que muestran que si la selección morfológica no es correcta, se pueden elegir espermatozoides con el ADN fragmentado, incluso en muestras diagnosticadas como normozoospermicas [17].

Además, estudios con MSOME han relacionado una mala morfología del espermatozoide con bajas tasas de implantación y embarazo [23, 34, 64], y a su vez con defectos cromosómicos de la célula espermática que pudieran ser transferidos al embrión [48, 57]. Pero, también encontramos datos que muestran que incluso el espermatozoide de mejor calidad puede tener alteraciones en el ADN, así por ejemplo se ha documentado como espermatozoides sin defectos morfológicos pueden afectar a la calidad embrionaria y la probabilidad de embarazo, al relacionarse con la fragmentación del ADN [83]. Con lo cual, se ha sugerido que los métodos actuales de selección de espermatozoides son inadecuados [76], y para optimizar la calidad del espermatozoide se han desarrollado métodos como el MSOME [15].

Por todo lo expuesto, y dado que uno de los objetivos de este estudio ha sido valorar si el método de selección de espermatozoides para la microinyección influiría en los resultados de los ciclos de recepción ovocitaria, consideramos la importancia de evaluar el potencial clínico de todas las muestras seminales, independientemente de su calidad o procedencia.

Al comparar los resultados, la primera diferencia significativa encontrada entre grupos, IMSI e ICSI, fue en la procedencia de la muestra utilizada. El 32.4% de las ICSI se realizaron con semen de donante, frente al 14.8% de las IMSI. No podemos mostrar datos, pero en nuestro centro, prácticamente el total de las muestras de semen de donante utilizadas en un proceso de microinyección han sido previamente testadas en IA, con lo cual son muestras con fertilidad probada y con embarazos a término. Solamente, un pequeño porcentaje de muestras de semen de donante son por primera vez destinadas a microinyección. Esto suele ocurrirnos en casos donde las

características fenotípicas no encajan con ninguno de los sémenes de fertilidad probada. Con lo cual, podemos pensar que en los ciclos de ICSI con semen de donante el posible factor masculino fue eliminado.

Por otro lado, en cuanto a las muestras de semen homólogo, el 56.9% fue eyaculado congelado dirigido para IMSI. La congelación de semen se ha asociado con posibles daños en las membranas celulares, así como con alteraciones metabólicas [84]. Pero, cuando se seleccionan los mejores espermatozoides para fecundar los óvulos a través de ICSI no se han mostrado diferencias entre los resultados de un ciclo de microinyección, bien sea con semen congelado o fresco [22]. Por lo tanto, asumimos que al no existir diferencias significativas en las características basales del semen homólogo entre técnicas, este aumento significativo en el número de muestras congeladas (IMSI: 56.9%; ICSI: 48%) no influiría en nuestros resultados.

El daño del ADN espermático es otro posible factor molecular implicado en la fertilidad, mostrándose como un posible marcador de los fallos de implantación [79, 80]. En la actualidad, contamos con diferentes kits comerciales, como podría ser el Halosperm [56], para valorar la integridad del ADN espermático. Sin embargo, la fragmentación del ADN espermático aún no se ha establecido como una prueba diagnóstica y de rutina en los laboratorios [5], es por ello que solo se había realizado la prueba de la fragmentación a 213 pacientes. Pero, está establecido en la literatura que cuando el IF es superior al 30% la capacidad fecundante del paciente se encuentra comprometida [56]. Aunque, también se han mostrado escasas opciones de embarazo en pacientes con muestras que tenían el 27% de los espermatozoides con ADN desnaturalizado [39].

Según los resultados de nuestro estudio, en la población general la media de fragmentación del ADN espermático fue significativamente mayor en el grupo IMSI (IMSI: 23.23 ± 8.73 ; ICSI: 20.26 ± 9.09), sin embargo el IF mayor al 30% fue

Discusión

equiparable entre grupos. Con lo cual, no podemos asegurar que el IF pudiese condicionar nuestros resultados.

También se observó una diferencia significativa en el número de óvulos microinyectados (IMSI: 12.48 ± 3.06 ; ICSI: 12.00 ± 2.94). Creemos que esta diferencia podría estar influenciada por el tamaño de la muestra (IMSI= 934; ICSI= 565). Sin embargo, la tasa de fecundación y el número total de embriones se mostraron similares entre técnicas.

Otra de las características significativas entre grupos fue el porcentaje de embriones de buena calidad (IMSI: 52.42 ± 25.3 ; ICSI: 55.99 ± 25.60). En este sentido, si podemos decir que en el grupo ICSI se congelaron mejores embriones y esto podría repercutir en la tasa de gestación acumulada por ciclos. Esta diferencia significativa podría estar influenciada porque en este grupo se usaron más muestras de semen de donante. Finalmente, y a pesar de que se transfirieron más embriones en el grupo IMSI (IMSI: 1.94 ± 0.24 ; ICSI: 1.90 ± 0.31), no se observaron diferencias en las tasa de implantación, en la gestación clínica, el aborto y el embarazo a término.

Sin embargo, a pesar de encontrar ciertas diferencias significativas entre las dos técnicas, el embarazo a término, y el hecho de tener un niño nacido en casa no mostró diferencias entre grupos, independientemente de que se realizase IMSI o ICSI. Con lo cual, si aceptamos que una buena selección espermática para el proceso de microinyección repercute en nuestros resultados, no podemos asegurar que con la óptica de contraste diferencial de interferencia de Nomarski se realice una mejor selección de los espermatozoides. Consideramos, que en esta población general de estudio, la óptica usada de forma habitual en los laboratorios de reproducción asistida, como es la de contraste por modulación de Hoffman, sigue siendo apta para seleccionar espermatozoides de buen pronóstico.

Los espermatozoides para los ciclos de IMSI fueron seleccionados a 900 aumentos siguiendo los criterios de Bartoov [15]. La selección de espermatozoides siguiendo este criterio se ha relacionado con una buena integridad del núcleo espermático [35]. Se ha reportado que independientemente del número de espermatozoides normales encontrados en la muestra, la probabilidad de conseguir un mayor número de embriones en estadio de blastocisto ocurre en ciclos donde se usa la IMSI [64], ya que se supone que la probabilidad de seleccionar un espermatozoide normal es mayor. Esta idea, se enlaza con el hecho de que la IMSI permite excluir a espermatozoides con defectos nucleares, pudiendo disminuir la probabilidad de inyectar óvulos con espermatozoides que tengan su ADN dañado [49]. Con lo cual, se ha planteado la idea de ofrecer la técnica IMSI como herramienta complementaria a la mayoría de los pacientes indicados para realizar un ciclo de microinyección espermática [23]. Sin embargo, los resultados de nuestro estudio en esta población general, no posiciona a la técnica IMSI como un mejor método para realizar la microinyección espermática.

Por otro lado, en otros estudios se ha evaluado el porcentaje de vacuolas, para así relacionarlo con los resultados del ciclo [23, 67]. Sin embargo, en nuestro estudio el porcentaje de vacuolas no fue recogido. Considerando ciertas citas de la literatura, asumimos que la probabilidad de seleccionar espermatozoides vacuolados fue menor cuando se realizó IMSI [23]. Por ejemplo, en pacientes referidos para ICSI por OAT se ha postulado que la probabilidad de seleccionar espermatozoides sin vacuolas o con menos de dos vacuolas pequeñas durante el proceso de IMSI es alta [67].

En base a los resultados de este estudio, podríamos decir, al igual que otros autores, que a 400 aumentos se pueden detectar ciertas anomalías morfológicas que estarían implicadas de forma negativa en los resultados finales de un ciclo, como son por ejemplo las vacuolas grandes [67]. Puede ser que la proporción de espermatozoides de mal pronóstico dentro de la misma muestra de semen

comprometa la selección de espermatozoides aptos para la microinyección. Sin embargo, aunque la resolución óptica de la microscopía de contraste por modulación de Hoffman sea menor, la selección morfológica de espermatozoides con esta óptica no tendría mayores implicaciones sobre el proceso final de un ciclo como es el embarazo a término.

Por otro lado, el estudio de la morfología fue realizado siguiendo los criterios de la OMS 1992 [74], y el porcentaje de vacuolas tampoco fue recogido durante la realización del seminograma. El aumento del número de abortos ha sido relacionado con el aumento de las vacuolas, pero anomalías tales como una desviación en forma o tamaño de la cabeza espermática parecen no tener tantas repercusiones en los embarazos a término [35]. Por lo que respecto a las muestras espermáticas utilizadas, en nuestros ciclos de microinyección, cabe pensar que la selección de espermatozoides sin vacuolas grandes, de haberlos, se habrían eliminado tanto con la IMSI como con la ICSI, ya que las tasas de abortos se mantienen equiparables, independientemente de la técnica empleada.

Sin embargo, no podemos contrastar nuestros resultados con los de otros estudios realizados. Según nuestros conocimientos, no se han realizado estudios de IMSI con muestras congeladas, o con muestras de semen de donante. Lo único que podemos discutir con la literatura es que la mayoría de los pacientes (80.9%) realizaban su primer ciclo, no mostrando la media de ciclo diferencias significativas entre los dos grupos (IMSI: 1.23 ± 0.50 ; ICSI: 1.23 ± 0.53). De esta manera, no podemos apoyar la idea expuesta por Vanderzwalmen [23] de que un primer ciclo es requisito necesario para realizar una IMSI, porque la mejor selección se traducirá en mejores resultados.

No obstante, existen publicaciones que empiezan a mostrar beneficios de la IMSI cuando nos encontramos ante dos ciclos fallidos de ICSI [65]. Quizá, este sería el

motivo por el que pacientes en un primer ciclo de IMSI no encuentran beneficios de esta técnica. Sin embargo, también encontramos un estudio que compara ambas técnicas dentro de una población general, con dos o más ciclos fallidos de microinyección, tanto con factor masculino como sin él, donde no se muestran diferencias significativas en términos de tasas de fecundación e implantación, gestación clínica y embarazo a término [68]. Con lo cual, apoyamos la idea de otros autores al exponer que la población que se puede beneficiar de la técnica IMSI permanece aún en debate [42], y puede que este reservado para determinados perfiles de pacientes.

Por esta razón, nos vimos en la necesidad de desglosar los datos y formar grupos y subgrupos de estudio, dependiendo de la procedencia de la muestra y de las calidades seminales.

1. Ciclos de microinyección con muestras de semen en fresco

Todos los pacientes que recogieron la muestra en fresco el día de la punción tampoco encontraron beneficios de la técnica IMSI, independientemente de la calidad seminal o el tipo de la muestra utilizada para la microinyección. Por lo tanto, no podemos asegurar que un tipo de microscopía más resolutiva sea fundamental para aumentar los embarazos en este perfil de pacientes.

Los resultados de nuestro estudio dentro del grupo de muestras en fresco, muestran el porcentaje de formas normales examinado en el seminograma (IMSI: 20.41 ± 7.75 ; ICSI: 22.80 ± 9.16) como una de las diferencias significativas entre técnicas.

En el análisis seminal de rutina, la valoración de la morfología espermática es aplicada en toda la muestra. Pero, una vez llevada a cabo la capacitación trabajamos solo con la fracción móvil. Esta movilidad supone una ventaja para la valoración de la morfología, y además el MSOME se ha presentado como la mejor herramienta para

valorar morfológicamente los espermatozoides móviles de la muestra [18]. Con lo cual, la teratozoospermia se ha posicionado como una de las principales indicaciones de la IMSI, mostrándose diferencias significativas en las gestaciones clínicas a favor de la técnica [49]. Sin embargo, los resultados de este estudio indican lo contrario.

A pesar de contar con un mayor grado de teratozoospermia en las muestras destinadas para IMSI las tasas de fecundación e implantación, la gestación clínica, el aborto y el embarazo a término, no mostraron diferencias significativas entre ambas técnicas. En pacientes referidos para microinyección con muestras en fresco se podría pensar que la IMSI pudo llegar a ser un beneficio a la hora de seleccionar espermatozoides con mejor pronóstico para aquellos pacientes que tenían menor porcentaje de formas espermáticas normales en la muestra, haciendo que los resultados entre grupos se equiparasen. Sin embargo, el análisis estadístico en el subgrupo de las muestras en fresco con teratozoospermia indicó lo contrario.

El estudio comparativo entre ambas técnicas, en el subgrupo marcado por la teratozoospermia, muestra características de los ciclos similares, lo que proporciona una estabilidad final en los resultados, ya que no se muestran diferencias significativas en términos de tasas de fecundación e implantación, gestación clínica, aborto y embarazo a término. Sin embargo, apreciaremos que la diferencia de la muestra (IMSI=224; ICSI=71) podría interferir en nuestros resultados.

A pesar de encontrar estudios comparativos entre IMSI e ICSI con pacientes referidos a microinyección por presentar teratozoospermia no podemos compararlos con nuestros resultados. Un estudio comparativo llevado a cabo con 258 pacientes, de los cuales 132 fueron dirigidos a IMSI y 126 a ICSI, no mostró diferencias en las características generales de los grupos, pero sí beneficios significativos de la IMSI en cuestión de porcentaje de embriones totales y de buena calidad, en las tasas de implantación, en la gestación clínica y en el embarazo a término [85]. No obstante, la

teratozoospermia no fue valorada según nuestro método, y además solo se incluyeron en estudio pacientes con menos de un 10% de las formas normales. Conclusiones similares se muestran en un estudio llevado a cabo con 122 pacientes diagnosticados con teratozoospermia [86]. Sin embargo, este autor, no muestra sus resultados de embarazo a término. Consideramos esta ausencia como uno de los principales inconvenientes del estudio.

El embarazo a término es el objetivo final y más importante para los pacientes que tienen que someterse a una TRA. Además, existen eventos en los que ciertos resultados en el ciclo que pueden parecer prometedores, no son el reflejo de un aumento de los embarazos a término. En el estudio llevado a cabo por el grupo de Balaban [69], un estudio comparativo entre ciclos de IMSI e ICSI dentro de un subgrupo de pacientes con factor masculino muestra mejor tasa de implantación en el grupo de IMSI. Sin embargo, el embarazo a término no llegó a mostrar diferencias significativas entre ambos grupos. En cualquier caso, nos encontramos con la dificultad para poder valorar estos resultados con los nuestros, ya que no se publicaron las características basales de las muestras espermáticas en este subgrupo y no sabemos con qué tipo de factor masculino se trabajó.

Sin embargo, nosotros tampoco reportamos beneficios de la técnica IMSI cuando nos encontramos con un factor masculino severo como es la OAT.

A pesar de no existir un consenso generalizado, parece que el área vacuolar aumenta de manera significativa cuando la muestra espermática tiene alguna deficiencia, tal como una disminución de la concentración y movilidad, viabilidad alterada, o bajo número de espermatozoides normales en la muestra [51, 87]. Si aceptamos lo expuesto, quizá una explicación viable sea aceptar que a medida que aumenta el área vacuolar es posible discriminar a este tipo de espermatozoides mediante la óptica de contraste de Hoffman. Con lo cual, en las muestras OAT los

espermatozoides con vacuolas grandes no se habrían seleccionado con ninguna de las técnicas.

Por otro lado, el aumento de vacuolas en una misma muestra seminal puede dificultar la selección de espermatozoides aptos para microinyectar, pero se ha visto como la selección de espermatozoides con alguna anomalía morfológica no tiene mayores implicaciones en los resultados de un ciclo, incluso cuando se trabaja con muestras OAT [67].

Encontramos publicado un estudio llevado a cabo con 350 pacientes dirigidos para microinyección por OAT [67]. Dentro de la misma cohorte ovocitaria se realizó una randomización de los óvulos. Se microinyectaron 1557 mediante IMSI y 1548 con ICSI. Se llegó a la transferencia embrionaria de 125 casos de IMSI y 139 de ICSI. No se encontraron diferencias en cuanto a las tasas de fecundación e implantación, calidades embrionarias en día 3 o 5 de desarrollo y gestación clínica. En este estudio, ninguno de los espermatozoides seleccionados para IMSI, independientemente de su morfología según los criterios del MSOME, mostraron mejores resultados clínicos. Aunque cabe destacar que la mayoría de las microinyecciones se pudieron llevar a cabo con espermatozoides sin vacuolas o con menos de dos vacuolas pequeñas. Es decir, la selección morfológica de espermatozoides de buen pronóstico en este tipo de muestras no está condicionada por su calidad inicial, ni por el tipo de microscopía utilizada para la selección.

Sin embargo, otro estudio llevado a cabo dentro de otra población caracterizada por la OAT reporta mejores tasas de implantación y gestación clínica con IMSI cuando comprara 227 ciclos de IMSI con 219 de ICSI [65]. Aunque, desglosando por número de ciclo realizado, realmente quien se beneficia de la técnica IMSI, en términos de gestación clínica, es el grupo que ha tenido al menos dos ciclos fallidos de microinyección. Con lo cual, esto podría explicar nuestros resultados, ya

que mostramos una media de ciclos mucho menor (IMSI: 1.22 ± 0.45 ; ICSI: 1.20 ± 0.40). Al igual que el estudio llevado a cabo por el grupo de De Vos [67], que no muestra beneficios de la IMSI en pacientes diagnosticados con OAT, y muestra una media de ciclos más similar a la nuestra (IMSI: 1.7 ± 1.1 ; ICSI: 1.7 ± 1.2).

Pero, cuando nos encontramos en un primer ciclo, con el diagnóstico común de la OAT según las nuevas recomendaciones de la OMS 2010, se han mostrado diferencias significativas a favor de la IMSI, en las tasas de fecundación e implantación y en la gestación clínica [66]. Aunque, al igual que otros autores, en este estudio, no se muestran beneficios en las calidades embrionarias, ni en las tasas de aborto [49, 65].

El nuevo manual de la OMS [88] para el diagnóstico de las muestras seminales acota los valores de referencia marcados por la OMS de 1999 [43], que son los valores de referencia encontrados en la mayor parte de la bibliografía y con los que se ha trabajado para realizar este estudio, a excepción de la morfología espermática que fue valorada siguiendo las recomendaciones del manual de la OMS de 1992 [74]. Por lo que, el hecho de acotar estos valores de referencia podría mostrar beneficios de la IMSI. Es decir, la presencia de un factor masculino muy severo podría ser una posible indicación de la IMSI. Y podría explicar los resultados de Balaban [69], que muestra beneficios en las tasas de implantación cuando realiza IMSI en un subgrupo de pacientes con factor masculino, y en especial en aquellos con concentraciones seminales menores a 1×10^6 ml.

Por otro lado, nos pareció interesante valorar los resultados cuando se utilizaron muestras de pacientes con un perfil de su ADN espermático. Se han mostrado diferencias significativas a favor de la IMSI, en términos de implantación y nacidos vivos, independientemente del rango de fragmentación de la muestra: menor de 30, entre 30 y 40, o mayor del 40% [49]. Al igual que en nuestro estudio, no se

había realizado la prueba de fragmentación ni el mismo día de la microinyección, ni a todos los pacientes del estudio.

En Ginefiv, se suele realizar la prueba de fragmentación a pacientes con ciclos previos de microinyección espermática con óvulos homólogos o heterólogos, que mantienen repetidos fallos de implantación, abortos y/o mala calidad embrionaria, pacientes con historial clínico de infecciones genitourinarias, e incluso pacientes fumadores y expuesta a tóxicos ambientales. La problemática fue encontrar dentro del grupo de las muestras en fresco solo 132 pacientes con la prueba de la fragmentación del ADN espermático realizada. La explicación es que la integridad del ADN espermático no es el objetivo directo de las técnicas seminales usadas de forma rutinaria en el laboratorio de andrología.

El análisis de resultados en este subgrupo de estudio mostró diferencias significativas en cuanto al porcentaje de fragmentación entre grupos (IMSI: 24.36 ± 7.84 ; ICSI: 19.98 ± 9.06). Sin embargo, no existieron diferencias en ningún otro parámetro seminal o características del ciclo, a excepción del número de óvulos microinyectados (IMSI: 13.45 ± 2.85 ; ICSI: 12.15 ± 3.2). Pero, no pensamos que esta diferencia pueda tener una repercusión en el embarazo a término. Por otro lado, el número de casos con el IF superior al 30% fue bajo (IMSI=11; ICSI=7), y además no mostró diferencias significativas entre grupos (IMSI: 37.82 ± 6.80 ; ICSI: 38.43 ± 6.77).

Con nuestros resultados, no podemos asegurar un beneficio aparente de la IMSI en el subgrupo de pacientes con muestras en fresco y un perfil de fragmentación del ADN espermático. Sin embargo, tampoco podemos afirmar que el aumento de fragmentación de la muestra haga disminuir nuestros resultados cuando realizamos IMSI. Pero, también deberíamos tener en cuenta que la fragmentación puede ser un parámetro variable dentro de una población de estudio [89], bien por exposición a

ciertos tratamientos como los antioxidantes o bien porque la exposición a tóxicos hasta el momento de la microinyección puede variar éste porcentaje.

2. Ciclos de microinyección con muestras de semen congelado

La congelación de una muestra seminal fue descrita por primera vez en la década de los años 50 [90]. Desde este momento, y a lo largo de los años, las TRA se han adaptado para poder usar muestras de semen congelado. Por ejemplo, el uso de semen congelado se ha hecho indispensable en los casos donde hay que recurrir a un donante de semen, o cuando la obtención de la muestra el mismo día de la punción supone un inconveniente para el paciente. Por otro lado, la donación de óvulos ha encontrado en la congelación de semen la mejor forma para sincronizar los ciclos entre la receptora y la donante, evitando coincidir a la pareja receptora y a la donante el mismo día en el centro. La congelación de semen también proporciona un beneficio cuando se trabaja con un programa de recepción de óvulos internacional, como es el caso de Ginefiv, donde aproximadamente el 60% de los ciclos de recepción de óvulos se hace en parejas extranjeras. Algunas de estas causas nos han llevado a encontrarnos que en este estudio el 53.5% de las microinyecciones se hicieran con muestras congeladas.

Uno de los principales efectos del proceso de congelación y descongelación es la pérdida de movilidad y vitalidad causada principalmente por la recristalización de microcristales del agua intracelular [91], y como consecuencia se puede producir un malogro de las estructuras celulares. Sin embargo, en el mercado existen una variedad de crioprotectores que intentan mermar estos efectos. Aunque, también se ha documentado que el proceso de lavado posdescongelación para eliminar los restos de crioprotector tiene una implicación en la integridad de la membrana plasmática y en la función mitocondrial [92]. Otro posible efecto sería la modificación de la membrana

acrosomal [93] provocando un efecto negativo en la reacción acrosómica y en consecuencia en la unión de los dos gametos.

Recientemente, un estudio ha mostrado que la metodología del MSOME sería la mejor herramienta para evaluar muestras de semen congelado. El argumento del estudio se basa en que la integridad el núcleo espermático después del proceso de descongelación está relacionada con una peor morfología, y con un aumento en el porcentaje de vacuolas, con lo cual la IMSI podría ser la mejor elección para pacientes que tienen muestras congeladas [87]. Sin embargo, no encontramos ningún estudio que valore los posibles beneficios de la IMSI cuando trabajamos con muestras congeladas, y lo relacione con los resultados finales un ciclo de microinyección. Por lo que nos pareció interesante estudiar al grupo de las muestras congeladas en su conjunto y de forma individualizada por tipos de muestras espermáticas utilizadas.

Nuestros resultados avalan que existen ciertos tipos de muestras, pertenecientes a pacientes de fertilidad limitada, en las que la congelación puede ir en detrimento de los resultados del ciclo de microinyección. Sin embargo, cuando utilizamos la técnica IMSI se obtienen resultados similares a los que obtendríamos con este tipo de muestras en fresco, con lo cual un tipo de microscopía más potente como es la de contraste por interferencia diferencial de Nomarski sería la óptica más apropiada para llevar a cabo la selección espermática en este tipo de pacientes, y garantizar que a pesar de tener que congelar las muestras por motivos ineludibles antes de la punción, los resultados finales del ciclo no se van a ver comprometidos.

En el grupo de los 802 pacientes con muestras congeladas se mostraron dos claras diferencias significativas: el número de ciclo (IMSI: 1.15 ± 0.39 ; ICSI: 1.05 ± 0.21), y el porcentaje de embriones de buena calidad (IMSI: 52.52 ± 25.74 ; ICSI: 56.49 ± 26.42). Por un lado, y aunque se haya reportado un beneficio de la técnica IMSI a medida que el número de ciclos fallidos aumenta, en nuestro grupo de estudio

no superamos la media de dos ciclos por paciente, y no creemos que esta diferencia significativa influyera en los resultados. Y por otro lado, no creemos que el aumento significativo de la calidad embrionaria en el grupo de ICSI tenga repercusiones en los resultados finales del ciclo, y en última instancia en el embarazo a término. La explicación sería que en ambos grupos la selección de buenos embriones para la transferencia no estuvo condicionada por este porcentaje. Lo que sí podemos apreciar es la repercusión de tener más número de embriones de buena calidad en el grupo de ICSI, ya que las opciones de gestación en los ciclos de desvitrificación de embriones en los pacientes sometidos a la técnica ICSI podrían ser mayores.

Se ha documentado como los parámetros seminales se ven afectados con el proceso de la congelación y la descongelación de semen, tanto en hombres fértiles, como en infértiles [87, 94, 95]. Sin embargo, parece ser que el requisito fundamental para llevar a cabo el proceso de fecundación sería poder seleccionar un espermatozoide móvil, funcional y competente [77], que será aquel en el que se haya producido una condensación de la cromatina al reemplazar las histonas por protaminas.

Boitrelle [87] expone que con la congelación de semen se aumenta el número de espermatozoides con cromatina descondensada en la muestra, se induce la formación de vacuolas, y se disminuye de manera significativa el porcentaje de espermatozoides de buen pronóstico, que son aquellos que tienen una buena morfología y con menos de dos vacuolas pequeñas en su núcleo.

En la población general de pacientes con muestras congeladas no podemos reportar beneficios de la IMSI en cuanto a mejor método de selección, ya que los resultados en términos de tasas de fecundación e implantación, y gestación clínica, aborto y embarazo a término son equiparables. Con lo cual, reportamos que la selección de espermatozoides en el grupo ICSI no tiene mayores implicaciones en los

resultados finales del ciclo. De hecho, congelar más embriones de buena calidad en el grupo ICSI pudo ser incluso una ventaja de cara a los ciclos de desvitrificación de embriones. Sin embargo, para ciertos pacientes de esta población, la ICSI sí podría tener ciertas repercusiones.

El porcentaje de formas normales recogido en nuestro estudio se llevó a cabo con la muestra en fresco el día de la prueba del seminograma. Sin embargo, se ha reportado como el porcentaje de formas normales disminuye considerablemente cuando las muestras seminales se someten al proceso de la congelación y la descongelación [87, 94]. Algunos autores han mostrado como la disminución de las formas normales dependerá de los parámetros seminales, y en concreto la teratozoospermia se ha marcado por ser un parámetro que puede verse afectado después de descongelar [87, 96]. Se ha reportado un aumento significativo de las formas anormales de la muestras diagnosticadas como teratozoospermias en fresco, llegando a encontrar casi el 75% de los espermatozoides con cabezas amorfas, colas enrolladas y/o con gran vacuolización después de la descongelación [87].

En el subgrupo de muestras congeladas teratozoospermias la única diferencia significativa encontrada fue el número de ciclo realizados (IMSI: 1.12 ± 0.35 ; ICSI: 1.03 ± 0.17), parámetro que no creemos que influya en nuestros resultados. Sin embargo, cabe destacar que se apreció una tendencia a mayor tasa de fecundación en el grupo IMSI (IMSI: 64.92 ± 16.96 ; ICSI: 61.99 ± 18.52), aunque esta diferencia no llegó a ser significativa ($p=0.08$).

La presencia de vacuolas grandes, o una mala morfología espermática podrían ser la evidencia de una pérdida de condensación en la cromatina [48, 53, 57], y la descondensación de la cromatina puede afectar al proceso de la fecundación [97]. Esta alteración fisiológica podría ser el reflejo de un efecto paterno temprano, visible en el estadio de pronúcleos. Y puede que una selección espermática más pulida en el

grupo IMSI nos haya llevado a encontrar esta tendencia en la tasa de fecundación. Sin embargo, y a pesar de que el porcentaje de fecundación parece mejor en el grupo IMSI, los resultados finales en términos de tasa de implantación, gestación clínica, y sobretodo aborto y embarazo a término se mantienen entre grupos. Con lo cual, el hecho de trabajar con muestras congeladas teratozoospermicas no implica en ninguna de las técnicas un efecto paterno tardío, ya que los resultados finales entre las técnicas se mantienen.

Consideramos que con la óptica de contraste por modulación de Hoffman se pudieron discernir los espermatozoides de mal pronóstico en el subgrupo de muestras teratozoospermicas congeladas, haciendo posible seleccionar espermatozoides de peor morfología o con una cromatina menos condensada que pudo influir de manera no significativa en el proceso de fecundación por ser más inestable, pero que no tuvo repercusión en el número de embarazos a término.

Se ha documentado que durante la realización de una ICSI no se pueden discernir ciertas características de los espermatozoides de buen pronóstico [23, 55], pero quizá y tal y como postulo De Vos si las grandes vacuolas y cabezas amorfas [67] originadas tras el proceso de congelación, que en definitiva son las anomalías espermáticas que se han relacionado con mayor porcentaje de cromatina descondensada [48, 57, 87]. Por otro lado, a pesar de que la morfología de los espermatozoides de la muestra puede variar tras el proceso de congelación, no se ha encontrado una relación entre el aumento de las formas anormales en la muestra y el porcentaje de fragmentación del ADN. Parece ser, que ciertas características fenotípicas de los espermatozoides de algunos pacientes infértiles podrían no ser el reflejo del genotipo de la célula espermática [98].

La descongelación tiene un efecto per se sobre los espermatozoides, reduciendo el porcentaje de espermatozoides vivos tanto en pacientes

Normozoospermicos, astenozoospermicos, oligoastenozoospermicos y teratozoospermicos [87, 94, 98]. También sabemos que el porcentaje de formas normales de la muestra se reduce [87]. A su vez, el proceso de lavado posdescongelación tiene un efecto en la movilidad de la muestra. La dilución de la muestra en un medio de cultivo, y la posterior centrifugación y resuspensión en un medio final, para eliminar los restos de crioprotector, tienen una consecuencia en la integridad de la membrana plasmática y en la función mitocondrial [92]. Lo cual hace que la movilidad de los espermatozoides se reduzca. Sin embargo, para la microinyección es necesario solo unos cuantos espermatozoides móviles, por eso la congelación es una opción incluso para muestras de baja calidad y con baja concentración [94].

Sin embargo, en base a nuestros resultados pensamos que este agravio sufrido por las muestras seminales no tiene por qué afectar a los resultados finales de un ciclo si utilizamos un sistema de selección espermática más preciso para realizar el proceso de microinyección.

En nuestro estudio estadístico encontramos diferencias significativas que posicionan a la IMSI como el mejor método cuando trabajamos con muestras congeladas OAT. Ante parámetros seminales y condiciones del ciclo similares, la tasa de implantación (IMSI: 26.37 ± 36.00 ; ICSI: 14.40 ± 29.43), la gestación clínica (IMSI: 38.5%; ICSI: 15.3%) y el embarazo a término (IMSI: 33%; ICSI: 13.6%) muestran diferencias significativas a favor de la IMSI. Sin embargo, al igual que otros autores no encontramos beneficios ni en las calidades embrionarias, ni en el porcentaje de aborto [49, 65].

Cuando hablábamos de las muestras en fresco con OAT mostrábamos que la selección morfológica de espermatozoides de buen pronóstico no está condicionada por este diagnóstico cuando seguimos las recomendaciones de la OMS 1999. Sin

embargo, se ha reportado que cuando se acotan los parámetros de concentración, movilidad y morfología se aprecia un claro beneficio de la IMSI [66, 69].

Los espermatozoides inmaduros se caracterizan por pérdida de integridad en la membrana plasmática y en la del acrosoma, aumento de aneuploidías, y cromatina descondensada, características que podrían hacer al espermatozoide más vulnerable a sufrir daños en la cadena de ADN. Todos estos factores pueden afectar a la fertilidad masculina y al mismo tiempo ejercer un efecto paterno tardío en el cigoto [66].

Se ha visto como el éxito de la congelación de semen depende de la calidad inicial de las células espermáticas, y una baja calidad disminuye la crioresistencia [84, 98]. Con lo cual podemos asumir que el hecho de congelar muestras OAT aumentaría el número de espermatozoides inmaduros. Además, el agravamiento de los parámetros seminales como son la concentración, movilidad y morfología podrían estar implicando la imposibilidad de seleccionar espermatozoides competentes, en las muestras OAT congeladas, con la técnica de microscopía de contraste por modulación de Hoffman. Posiblemente, en este subgrupo la proporción de espermatozoides de buen pronóstico esté muy reducida, lo que hace de la IMSI una mejor herramienta. Sin embargo, al no haber recogido que tipo de espermatozoides fueron seleccionados, no podemos contrastar nuestros resultados con otros estudios que han clasificado morfológicamente los espermatozoides en función de su pronóstico, y los han relacionado con los resultados del ciclo.

Pero, si realmente consideramos que con la ICSI los espermatozoides de mal pronóstico para la consecución del embarazo pueden ser discriminados, el efecto de la IMSI en este grupo no debería deberse solo a la selección de espermatozoides sin vacuolas grandes y buena morfología. Creemos que debe existir otro tipo de defecto morfológico, visible a 900 aumentos, que nos haya llevado a no seleccionar este tipo de espermatozoides. Quizá la apreciación de una forma más perfilada a 900 aumentos

tanto de la membrana plasmática, como de la del acrosoma pudieran explicar los resultados en el grupo IMSI. Sin embargo, para confirmar esta consideración se deberían haber recogido los datos de las morfologías de los espermatozoides seleccionados.

Por otro lado, y a pesar de que el número de pacientes con muestra congelada, y un perfil de su ADN espermático fue bajo ($n=81$), nos vimos en la necesidad de valorar este subgrupo de pacientes con muestras congeladas. El hecho de que la estabilidad de la cromatina disminuya tras el proceso de congelación puede tener consecuencias en la integridad del ADN espermático [94]. Aunque, por lo que encontramos publicado, parece ser que solo la integridad del ADN de pacientes con problemas de esterilidad se ve afectada [98]

Tras el proceso de descongelación se ha documentado un aumento de la fragmentación de doble cadena en pacientes con bajas concentraciones espermáticas [94]. La rotura de doble cadena puede tener consecuencias en la descendencia y se ha relacionado con un efecto tardío del espermatozoide en los resultados de un ciclo [79, 80, 99].

En este subgrupo de estudio los parámetros seminales se mantuvieron equiparables entre el grupo de IMSI y el de ICSI. El porcentaje de fragmentación entre grupos fue similar (IMSI: 19.10 ± 10.64 ; ICSI: 20.52 ± 9.18), y el número de casos en los que el IF llegó a ser superior al 30% fue bajo (IMSI=4; ICSI=8), y no mostró diferencias significativas entre grupos (IMSI: 39.00 ± 6.32 ; ICSI: 39.25 ± 4.77). Pero hay que tener en cuenta que los hombres infértiles son más susceptibles a ciertos agentes que pueden provocar daño en la doble cadena de ADN. El hecho de tener mayor incidencia de cromatina desorganizada hace que su cromatina sea más vulnerable o menos resistente a la hora de enfrentarse a esos posibles daños. Así pues, por ejemplo se ha mostrado como el ADN de espermatozoides de hombres

infértiles es más sensible a la exposición de rayos X [100]. La sensibilidad al proceso de congelación podría ser otra característica del ADN de los espermatozoides de este tipo de pacientes, ya que como hemos expuesto anteriormente, los pacientes que fueron sometidos a la prueba de la fragmentación fueron pacientes con claros problemas de infertilidad. Por otro lado, el hecho de congelar este tipo de muestras haría que el IF se hubiera empeorado, y esto podría explicar nuestros resultados.

En el subgrupo de muestras congeladas de pacientes con un perfil de fragmentación del ADN espermático, se reportan beneficios de IMSI en cuanto a la tasa de implantación (IMSI: 33.3 ± 32.91 ; ICSI: 8.3 ± 24.64), la gestación clínica (IMSI: 57.1%, ICSI: 10%) y el embarazo a término (IMSI: 23.8%; ICSI: 6.7%). Lo cual haría explicar, como en el subgrupo de muestras congeladas OAT, que los espermatozoides más inmaduros o de baja calidad son eliminados de la selección con la técnica IMSI. Sin embargo, no podemos asegurar que tipo de espermatozoides se seleccionaron en un grupo o en el otro, pero a la vista de los resultados, la IMSI supuso un beneficio.

Sin embargo, la probabilidad de aborto se muestra más alta en el grupo de IMSI (IMSI: 33.3%; ICSI: 5%), algo que no ha sido reportado en ningún estudio. Aunque cabe destacar que el único estudio que utiliza los IF de las muestras, para valorar la eficacia de la IMSI, no mostró el número de abortos [49].

Creemos que a pesar de que la IMSI hace aumentar considerablemente la tasa de implantación y gestación clínica, en el subgrupo de muestras congeladas con un IF determinado, posiblemente el efecto paterno transmitido por los daños generados en el ADN de este tipo de espermatozoides no se haya podido mantener durante el desarrollo embrionario avanzado. A pesar de conseguir embriones capaces de superar la ventana de implantación, los abortos fueron elevados cuando se realizó IMSI. Aun así, el embarazo a término fue mejor con esta técnica, con lo cual creemos que este tipo de muestras obtienen un beneficio de la IMSI.

3. Ciclos de microinyección con muestras de semen de donante

Para trabajar con un semen de donante en un ciclo de reproducción asistida es necesario criopreservar la muestra seminal. Por un lado, tenemos que asegurar a los pacientes que necesitan de un donante masculino que el semen con unas características fenotípicas y genotípicas concretas esté disponible el mismo día de la obtención de los óvulos. Por otro lado, la congelación de este tipo de muestras permite su uso diferido tras haber superado el periodo ventana de posibles infecciones víricas.

A pesar de que tras la descongelación de semen se reducen los parámetros seminales, los pacientes fértiles siguen manteniendo parámetros significativamente mejores que los que no lo son [98]. Por ello, todos los donantes debieron tener siempre los parámetros seminales por encima de lo establecido por la OMS [43, 74], y además las muestras fueron sometidas a una prueba de descongelación antes de ser aceptados como futuros donantes de semen en nuestro banco.

La congelación y descongelación de las muestras afecta al fenotipo de los espermatozoides, pero no afecta de igual manera a todos los genotipos [98]. Se supone que el ADN de los donantes es más resistente a los posibles efectos deletéreos que pueden conllevar la congelación y descongelación de las muestras, ya que el éxito de estos procesos depende de la calidad inicial.

La valoración de la morfología espermática mediante MSOME ha mostrado un aumento del porcentaje de vacuolas en pacientes con problemas de fertilidad tras la descongelación de las muestras [87]. Sin embargo, un estudio similar no muestra diferencias en este porcentaje de vacuolización cuando se descongelan muestras de pacientes con fertilidad probada [95]. Con lo cual podemos decir que aunque la congelación de los sémenes de donante tenga efectos sobre la movilidad, viabilidad y porcentaje de formas normales, la vacuolización y la integridad nuclear no se ven afectadas.

De esta manera y aunque los parámetros básicos se vieran disminuidos tanto en el grupo IMSI, como en el de ICSI, la selección de espermatozoides de buen pronóstico no debería verse comprometida. De ahí se resume la igualdad de los resultados finales del ciclo entre ambas técnicas.

Por lo que, la óptica de contraste de Hoffman sigue siendo una herramienta válida para seleccionar espermatozoides de donante y llevar a cabo el proceso de microinyección.

Después de realizar el estudio estadístico, observamos que el embarazo a término en la población general se situó en el 32%, y solamente apreciamos una bajada llamativa en este porcentaje cuando realizamos ICSI con muestras espermáticas de baja calidad que habían sido sometidas al proceso de congelación y descongelación. Aunque no podemos asegurar que la congelación afecte directamente a la integridad del ADN espermático, si parece que le haga más vulnerable a sufrir daños. Sin embargo, en el resto de pacientes valorados en el estudio vimos que independientemente de la calidad, de la procedencia de la muestra y de la técnica empleada, el porcentaje de embarazo a término prácticamente se mantuvo. Esto nos hace plantearnos que pueda existir un “efecto ovodonación”.

En un programa de donación de óvulos se ha visto como la calidad ovocitaria puede contrarrestar el efecto paterno y así aumentar la posibilidad de conseguir una gestación clínica [81]. Parece ser que el óvulo tiene la capacidad de reparar pequeñas cantidades de ADN espermático dañado [101]. Con lo cual, ciertas anomalías en los parámetros espermáticos que pudieran estar relacionadas con un genotipo paterno dañado o más sensible, podrían ser corregidas por la capacidad de reparación de óvulos de pacientes jóvenes y sin ningún problema aparente de fertilidad. El problema se plantearía cuando la reparación que tiene que llevar a cabo el óvulo sea tan excesiva que haga los resultados del ciclo disminuyan o que el embarazo no llegue a

término. En este caso, el gameto masculino estaría ejerciendo un efecto paterno negativo los resultados finales de un ciclo.

Por ello, creemos que ciertos pacientes con muestras espermáticas más susceptibles a sufrir daños en el ADN espermático, bien por tener muestras de baja calidad, o por estar relacionadas con problemas claros de fertilidad, no deberían congelarse, ya que hemos visto que el proceso de descongelación y descongelación puede disminuir sus probabilidades de ser padres. Sin embargo, y teniendo en cuenta la necesidad de tener que congelar el semen por motivos inamovibles cuando los pacientes se someten a un ciclo de reproducción asistida, creemos que la mejor opción es dirigir a estos pacientes a un ciclo de IMSI.

Por otro lado, puntualizar que nuestro estudio se enfrenta a varias limitaciones. Por un lado, contamos con la subjetividad a la hora de la valoración de la muestra, tanto en el seminograma como en el momento de la selección espermática para la microinyección. También, hay que tener en cuenta la variabilidad de los parámetros seminales en el tiempo [77], y remarcar que las calidades espermáticas no fueron recogidas el día de la microinyección.

En cuanto a la valoración de la morfología espermática el día del seminograma, comentar que en el momento de recogida de datos seguíamos utilizando la recomendación de la OMS 1992, que es menos estricta que la actual. Por lo tanto, muchas de las muestras teratozoospermicas del estudio a día de hoy no lo serían, y acotar los valores en este parámetro podría reportar beneficios de la IMSI. Aunque, también es cierto, que la disminución en el porcentaje de formas normales en las muestras congeladas no tuvo ninguna implicación para la técnica ICSI.

Finalmente, el número de aumentos conseguidos con la técnica de contraste de interferencia diferencial de Nomarski fue de 900 aumentos. Se han publicado otros estudios que utilizan rangos entre 900 y 1500 aumentos para la selección espermática

[22, 49, 61, 70]. Nuestra decisión a la hora de seleccionar a 900 aumentos fue por dos razones: el tiempo requerido y la resolución conseguida.

En primer lugar, consideremos el tiempo requerido para llevar a cabo una IMSI a más de 1500 aumentos, como uno de los inconvenientes de la técnica, ya que la selección de espermatozoides puede llevar desde 1 hora y media a 5 [35]. Además, se ha sugerido que el tiempo de manipulación y la temperatura a la que es sometida la muestra podría aumentar el porcentaje de vacuolas en la cabeza espermática [102]. Aunque, también se ha publicado que ni la temperatura, ni el estrés oxidativo llevan a la formación de vacuolas de *novo* [103]. Sin embargo, creemos, que tal y como se ha documentado, una manipulación extra podría aumentar la posibilidad de que el ADN espermático sufriera algún tipo de daño [104, 105].

En segundo lugar, el hecho de tener que llevar a cabo la selección en pantalla también aumenta el tiempo requerido, y además con la cámara digital que conecta el microscopio con la pantalla se consiguen más aumentos, pero no una mejor resolución [73].

En este estudio comparativo todos los ciclos se realizaron en el mismo periodo de tiempo, bajo idénticas condiciones de selección de pacientes, estimulación ovárica, equipo material y humano. Sin embargo, a pesar de las limitaciones presentadas, creemos que la única diferencia fue el tipo de microscopía usada para la selección de espermatozoides destinados a la microinyección.

Aun así, nos vemos en la necesidad de proponer futuros estudios. Creemos que nuestros resultados deberían compararse con ciclos de características similares pero seleccionando espermatozoides con la óptica de contraste diferencial de interferencia de Nomarski a más de 900 o 1500 aumentos. Además, consideramos la necesidad de realizar nuevos estudios prospectivos y randomizados, tanto en

Discusión

pacientes receptoras de óvulos, como en pacientes con óvulos propios, como con muestras diagnosticadas según el nuevo criterio de la OMS 2010 [88].

CONCLUSIONES

Conclusiones:

En nuestro estudio, utilizando dos tipos de microscopía de contraste para realizar la selección de espermatozoides destinados al proceso de microinyección espermática en óvulos de donante, observamos:

1. Según nuestros resultados, en una población general de pacientes receptoras de óvulos, las tasas de fecundación e implantación, y el porcentaje de gestación clínica, de aborto y de embarazo a término, se muestran similares independientemente del tipo de microscopía utilizada para realizar la selección espermática.
2. Nuestros resultados avalan que la microscopía de contraste por modulación de Hoffman para realizar una ICSI, sigue siendo un sistema válido para la selección de espermatozoides en la mayoría de los pacientes de la población seleccionada, exceptuando a aquellos pacientes con muestras seminales de baja fertilidad, y que han sido previamente criopreservadas.
3. De este estudio se deduce que la microinyección espermática con el sistema de microscopía de contraste por interferencia diferencial de Nomarski aumenta la eficacia de la tecnología de la reproducción en una población de pacientes con muestras criopreservadas: pacientes diagnosticados con oligoastenoteratozoospermia (OAT), y pacientes con diferentes índices de fragmentación (IF) en el ADN espermático. Ambos subgrupos de pacientes encuentran beneficios de la técnica IMSI en cuanto a la tasa de implantación, la gestación clínica y el embarazo a término.
4. En base a nuestros resultados, la técnica de IMSI quedaría reservada para pacientes con factores masculinos muy severos, donde la concentración, la movilidad espermática y la morfología se encontrasen por debajo de los valores de referencia establecidos por la OMS 1999 y 1992.

Conclusiones

5. Tras obtener estos resultados, se sugiere que pacientes con baja fertilidad podrían tener muestras más susceptibles a sufrir daños en el ADN espermático. Con lo cual, de verse expuestos a la necesidad de congelar la muestra espermática por un motivo ineludible, deberían dirigirse siempre a un ciclo de IMSI.
6. Finalmente, y sin que fuera uno de nuestros objetivos de estudio, apreciamos que excepto cuando se realiza ICSI a pacientes con baja fertilidad y muestras criopreservadas, el porcentaje de embarazo a término se mantiene entre los distintos grupos y subgrupos de la población de estudio, independientemente de la procedencia de la muestra, la calidad seminal o la técnica empleada para la selección espermática. Esta observación, nos hace plantearnos que pueda existir un posible “efecto ovodonación”.
7. El “efecto ovodonación” reflejaría la capacidad de reparación que los óvulos de pacientes jóvenes sin ningún problema aparente de fertilidad pudieran tener sobre el genoma del gameto masculino dañado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kamel, R.M., *Management of the infertile couple: an evidence-based protocol*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2010. **8**: p. 21.
2. Santamaría, L., *Aspectos bioéticos de las técnicas de reproducción asistida*. *Cuadernos de Bioética*, 2000. **1º**: p. 37-47.
3. Duran, H.E., et al., *Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success*. *Hum Reprod Update*, 2002. **8**(4): p. 373-84.
4. Panel, P., et al., [*Intra-uterine artificial insemination. Indications, techniques, results; 83 cases*]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 1995. **24**(5): p. 496-504.
5. Matorras, R.H., J., *Estudio y Tratamiento de la Pareja Estéril*. 1ª Edición. Madrid Adalia Farma S.L, 2007.
6. Forti, G.K., C., *Clinical review 100: Evaluation and treatment of the infertile couple*. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 1998. **83**(12): p. 4177-4188.
7. Allen, V.M., R.D. Wilson, and A. Cheung, *Pregnancy outcomes after assisted reproductive technology*. *J Obstet Gynaecol Can*, 2006. **28**(3): p. 220-50.
8. Palermo, G., et al., *Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte*. *Lancet*, 1992. **340**(8810): p. 17-8.
9. Palermo, G.D., et al., *ICSI: where we have been and where we are going*. *Semin Reprod Med*, 2009. **27**(2): p. 191-201.
10. Iritani, A., *Current status of biotechnological studies in mammalian reproduction*. *Fertil Steril*, 1988. **50**: p. 543-551.
11. Goto, K.K.A., Takuma. Y., *Fertilization by sperm injection in cattle*. *Theriogenology*, 1990. **33**: p. 238.
12. Lo Monte, G., et al., *Focus on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a mini-review*. *Asian J Androl*, 2013. **15**(5): p. 608-15.
13. Loutradi, K.E., et al., *The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection*. *J Assist Reprod Genet*, 2006. **23**(2): p. 69-74.
14. Bonduelle, M., et al., *Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children*. *Hum Reprod*, 1999. **14 Suppl 1**: p. 243-64.
15. Bartoov, B., et al., *Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome*. *J Androl*, 2002. **23**(1): p. 1-8.
16. Berkovitz, A., et al., *ART success and in vivo sperm cell selection depend on the ultramorphological status of spermatozoa*. *Andrologia*, 1999. **31**(1): p. 1-8.
17. Wilding, M., et al., *Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa*. *J Assist Reprod Genet*, 2011. **28**(3): p. 253-62.

Bibliografía

18. Oliveira, J.B., et al., *Motile sperm organelle morphology examination is stricter than Tygerberg criteria*. *Reprod Biomed Online*, 2009. **18**(3): p. 320-6.
19. Aitken, R.J., P.E. Warner, and C. Reid, *Factors influencing the success of sperm-cervical mucus interaction in patients exhibiting unexplained infertility*. *J Androl*, 1986. **7**(1): p. 3-10.
20. Kruger, T.F., et al., *Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization*. *Fertil Steril*, 1988. **49**(1): p. 112-7.
21. Mortimer, D., I.J. Pandya, and R.S. Sawers, *Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro*. *J Reprod Fertil*, 1986. **78**(1): p. 93-102.
22. De Vos, A., et al., *Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection*. *Fertil Steril*, 2003. **79**(1): p. 42-8.
23. Vanderzwalmen, P., et al., *Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles*. *Reprod Biomed Online*, 2008. **17**(5): p. 617-27.
24. Kupker, W., et al., *Morphology in intracytoplasmic sperm injection: preliminary results*. *J Assist Reprod Genet*, 1995. **12**(9): p. 620-6.
25. Nagy, Z.P., et al., *The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters*. *Hum Reprod*, 1995. **10**(5): p. 1123-9.
26. Svalander, P., et al., *The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to 'strict criteria' sperm morphology*. *Hum Reprod*, 1996. **11**(5): p. 1019-22.
27. Ubaldi, F. and L. Rienzi, *Morphological selection of gametes*. *Placenta*, 2008. **29 Suppl B**: p. 115-20.
28. Enginsu, M.E., et al., *Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quik staining: correlation of morphology with fertilization in vitro*. *Hum Reprod*, 1991. **6**(6): p. 854-8.
29. Miller, J.S.T., *The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro*. *Human Reproduction*, 2001. **16**: p. 918-924.
30. Berkovitz, A., et al., *Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome?* *Hum Reprod*, 2006a. **21**(7): p. 1787-90.
31. Berkovitz, A., et al., *How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection*. *Reprod Biomed Online*, 2006b. **12**(5): p. 634-8.

32. Bartoov, B., et al., *Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses*. Hum Reprod, 1994. **9**(11): p. 2069-75.
33. Ombelet, W., et al., *Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing*. Hum Reprod, 1997. **12**(5): p. 987-93.
34. Bartoov, B., et al., *Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection*. Fertil Steril, 2003. **80**(6): p. 1413-9.
35. Berkovitz, A., et al., *The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm*. Hum Reprod, 2005. **20**(1): p. 185-90.
36. Calogero, A.E., et al., *High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome*. Hum Reprod, 2001. **16**(7): p. 1433-9.
37. Burrello, N., et al., *Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes*. Hum Reprod, 2003. **18**(7): p. 1371-6.
38. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 493-501.
39. Larson, K.L., et al., *Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques*. Hum Reprod, 2000. **15**(8): p. 1717-22.
40. Gianaroli, L., et al., *Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection*. Fertil Steril, 2008. **90**(1): p. 104-12.
41. Huszar, G., et al., *Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects*. Reprod Biomed Online, 2007. **14**(5): p. 650-63.
42. Ebner, T., et al., *Some reflections on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*. Int J Fertil Steril, 2014. **8**(2): p. 105-12.
43. Salud, O.M.d.l., *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge University Press, Cambridge, 1999. **4th edn**.
44. Tanaka, A., et al., *Human sperm head vacuoles are physiological structures formed during the sperm development and maturation process*. Fertil Steril, 2012. **98**(2): p. 315-20.
45. Kacem, O., et al., *Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin*. Reprod Biomed Online, 2010. **20**(1): p. 132-7.

46. Montjean, D., et al., *Sperm vacuoles are linked to capacitation and acrosomal status*. Hum Reprod, 2012. **27**(10): p. 2927-32.
47. Del Río, M.G., A. Toro, A. Orellana, R. Cortés, M.E. Moreno, R.D. Virgil, P., *La reacción acrosómica del espermatoide: avances recientes*. Rev Int Androl., 2007. **5**(4): p. 368-73.
48. Franco, J.G., Jr., et al., *Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI*. Reprod Biomed Online, 2008. **17**(1): p. 42-5.
49. Hazout, A., et al., *High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI*. Reprod Biomed Online, 2006. **12**(1): p. 19-25.
50. Cayli, S., et al., *Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI*. Reprod Biomed Online, 2003. **7**(4): p. 462-8.
51. Perdrix, A. and N. Rives, *Motile sperm organelle morphology examination (MSOME) and sperm head vacuoles: state of the art in 2013*. Hum Reprod Update, 2013. **19**(5): p. 527-41.
52. Oliveira, J.B., et al., *Motile sperm organelle morphology examination (MSOME): intervariation study of normal sperm and sperm with large nuclear vacuoles*. Reprod Biol Endocrinol, 2010b. **8**: p. 56.
53. Franco, J.G., Jr., et al., *Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa*. Int J Androl, 2010. **35**(1): p. 46-51.
54. Perdrix, A., et al., *Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles*. Hum Reprod, 2011. **26**(1): p. 47-58.
55. Boitrelle, F., et al., *Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation*. Hum Reprod, 2011. **26**(7): p. 1650-8.
56. Fernandez, J.L., et al., *The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation*. J Androl, 2003. **24**(1): p. 59-66.
57. Garolla, A., et al., *High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status*. Reprod Biomed Online, 2008. **17**(5): p. 610-6.
58. Cassuto, N.G., et al., *Correlation between DNA defect and sperm-head morphology*. Reprod Biomed Online, 2012. **24**(2): p. 211-8.
59. Hammoud, I., et al., *Selection of normal spermatozoa with a vacuole-free head (x6300) improves selection of spermatozoa with intact DNA in patients with high sperm DNA fragmentation rates*. Andrologia, 2012. **45**(3): p. 163-70.
60. Oliveira, J.B., et al., *Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage*. Fertil Steril, 2010a. **94**(5): p. 1937-40.

61. Watanabe, S., et al., *An investigation of the potential effect of vacuoles in human sperm on DNA damage using a chromosome assay and the TUNEL assay*. Hum Reprod, 2011. **26**(5): p. 978-86.
62. Chelli, M.H., et al., *Can intracytoplasmic morphologically selected sperm injection be used to select normal-sized sperm heads in infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome?* Fertil Steril, 2010. **93**(4): p. 1347 e1-5.
63. Cassuto, N.G., et al., *Sperm fluorescence in situ hybridization study in nine men carrying a Robertsonian or a reciprocal translocation: relationship between segregation modes and high-magnification sperm morphology examination*. Fertil Steril, 2011. **96**(4): p. 826-32.
64. Knez, K., et al., *The IMSI procedure improves poor embryo development in the same infertile couples with poor semen quality: a comparative prospective randomized study*. Reprod Biol Endocrinol, 2011. **9**: p. 123.
65. Antinori, M., et al., *Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial*. Reprod Biomed Online, 2008. **16**(6): p. 835-41.
66. Setti, A.S., et al., *Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection benefits for patients with oligoasthenozoospermia according to the 2010 World Health Organization reference values*. Fertil Steril, 2011. **95**(8): p. 2711-4.
67. De Vos, A., et al., *Does intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improve embryo development? A randomized sibling-oocyte study*. Hum Reprod, 2013. **28**(3): p. 617-26.
68. Oliveira, J.B., et al., *Pregnancy outcomes in women with repeated implantation failures after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI)*. Reprod Biol Endocrinol, 2011. **9**: p. 99.
69. Balaban, B., et al., *Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study*. Reprod Biomed Online, 2011. **22**(5): p. 472-6.
70. Rovira, S.C., O. Brassesco, A. Del Rio, F. Prats, L. Rodriguez, M. Lafuente, R. Brassesco, M., *Validez de un sistema óptico con contraste de Hoffman en la selección de espermatozoides morfológicamente normales*. Rev Int Androl., 2010. **8**(4): p. 145-8.
71. Ugajin, T., et al., *The shape of the sperm midpiece in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection relates sperm centrosomal function*. J Assist Reprod Genet, 2010. **27**(2-3): p. 75-81.
72. Martínez Rojas, I., *Análisis y clasificación de maderas mediante técnicas no invasivas de baja energía*. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Madrid, 2012.

Bibliografía

73. Setti, A.S., et al., *Twelve years of MSOME and IMSI: a review*. *Reprod Biomed Online*, 2013. **27**(4): p. 338-52.
74. Salud, O.M.d.I., *Manual de Laboratorio de la OMS para el examen de semen humano y la interacción entre el semen y el moco cervical*. Editorial Medica Panamericana, 1992. **3ª edn.**
75. Zegers-Hochschild, F., et al., *International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2005*. *Fertil Steril*, 2009. **101**(2): p. 366-78.
76. Said, T.M. and J.A. Land, *Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review*. *Hum Reprod Update*, 2011. **17**(6): p. 719-33.
77. Romany, L.M., M. Remohí, J. Pellicer, A. Garrido, N., *Métodos para la selección objetiva de espermatozoides compententes*. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 2009. **26**(nº5): p. 425-435.
78. Krawetz, S.A., *Paternal contribution: new insights and future challenges*. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(8): p. 633-42.
79. Tesarik, J., *Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo*. *Reprod Biomed Online*, 2005. **10**(3): p. 370-5.
80. Tesarik, J., E. Greco, and C. Mendoza, *Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation*. *Hum Reprod*, 2004. **19**(3): p. 611-5.
81. Meseguer, M., et al., *Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality*. *Fertil Steril*, 2011. **95**(1): p. 124-8.
82. Abdalla, H.I., et al., *Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors*. *Hum Reprod*, 1993. **8**(9): p. 1512-7.
83. Mangiarini, A., et al., *Specific sperm defects are differentially correlated with DNA fragmentation in both normozoospermic and teratozoospermic subjects*. *Andrology*, 2013. **1**(6): p. 838-44.
84. Kopeika, J., A. Thornhill, and Y. Khalaf, *The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence*. *Hum Reprod Update*, 2015. **21**(2): p. 209-27.
85. El Khattabi, L., et al., *Is intracytoplasmic morphologically selected sperm injection effective in patients with infertility related to teratozoospermia or repeated implantation failure?* *Fertil Steril*, 2013. **100**(1): p. 62-8.

86. Knez, K., et al., *Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improves development and quality of preimplantation embryos in teratozoospermia patients*. *Reprod Biomed Online*, 2012. **25**(2): p. 168-79.
87. Boitrelle, F., et al., *Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation*. *J Androl*, 2012. **33**(6): p. 1371-8.
88. Salud, O.M.d.I., *Laboratory manual for the Examination and processing of human semen*. World Health Organization, 2010. **5th edn**.
89. Greco, E., et al., *Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment*. *J Androl*, 2005. **26**(3): p. 349-53.
90. Sherman, J.K., *Freezing and freeze-drying of human spermatozoa*. *Fertil Steril*, 1954. **5**(4): p. 357-71.
91. Watson, P.F., *Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function*. *Reprod Fertil Dev*, 1995. **7**(4): p. 871-91.
92. Oliva-Hernandez, J.M.-G., M., *Efectos de la descongelación-lavado sobre la motilidad, vitalidad y morfología de espermatozoides de baja calidad*. *Rev Int Androl.*, 2010. **8**(1): p. 14-20.
93. O'Connell, M., N. McClure, and S.E. Lewis, *The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function*. *Hum Reprod*, 2002. **17**(3): p. 704-9.
94. de Paula, T.S., et al., *Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia*. *Fertil Steril*, 2006. **86**(3): p. 597-600.
95. Gatimel, N., R. Leandri, and J. Parinaud, *Sperm vacuoles are not modified by freezing--thawing procedures*. *Reprod Biomed Online*, 2013. **26**(3): p. 240-6.
96. Kalthur, G., et al., *Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia*. *Fertil Steril*, 2008. **89**(6): p. 1723-7.
97. Tavalae, M., S. Razavi, and M.H. Nasr-Esfahani, *Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome*. *Fertil Steril*, 2009. **91**(4): p. 1119-26.
98. Donnelly, E.T., et al., *Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation*. *Hum Reprod*, 2001. **16**(6): p. 1191-9.
99. Gorelick, J.I. and M. Goldstein, *Loss of fertility in men with varicocele*. *Fertil Steril*, 1993. **59**(3): p. 613-6.

Bibliografía

100. Hughes, C.M., et al., *A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay*. Mol Hum Reprod, 1996. **2**(8): p. 613-9.
101. Ahmadi, A. and S.C. Ng, *Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa*. J Exp Zool, 1999. **284**(6): p. 696-704.
102. Peer, S., et al., *Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37 degrees C?* Fertil Steril, 2007. **88**(6): p. 1589-94.
103. Neyer, A., et al., *Sperm head vacuoles are not affected by in-vitro conditions, as analysed by a system of sperm-microcapture channels*. Reprod Biomed Online, 2013. **26**(4): p. 368-77.
104. Greco, E., et al., *Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa*. Hum Reprod, 2005. **20**(1): p. 226-30.
105. Gosalvez, J., et al., *DNA fragmentation dynamics in fresh versus frozen thawed plus gradient-isolated human spermatozoa*. Syst Biol Reprod Med, 2010. **56**(1): p. 27-36.

ANEXO

Esta tesis ha dado lugar a la presentación de un poster en el congreso de la SEF 2010 y a la publicación de un artículo en la revista de ASEBIR 2011:



IMSI: AUMENTO DE LAS TASAS DE IMPLANTACIÓN Y GESTACIÓN EN CICLOS DE OVODONACIÓN CON MUESTRAS TERATOZOOSPÉRMICAS.

Urda, C, Diaz A.R, Badajoz, V, Camacho, S, Cañadas, M.C, Gragera J.A, Bonache, R, Arenaza A.M.
Clínica Ginefiv, Unidad de Reproducción, Madrid, Spain

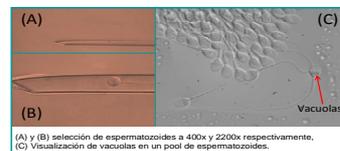
Introducción:

En la actualidad el MSOME (motile sperm organelar morphology examination) es el método más preciso para visualizar, a tiempo real y a una magnificación teórica de 6600x, la morfología y el porcentaje de vacuolas intranucleares del espermatozoide (1). La presencia de vacuolas pueden reflejar defectos moleculares responsables de las anomalías que se producen en el empaquetamiento de la cromatina durante la maduración espermática y por lo tanto, hacer al espermatozoide más vulnerable a sufrir daños en su ADN (3). De la unión del MSOME y la ya conocida microinyección espermática (ICSI) ha surgido la IMSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente). Con este estudio intentaremos demostrar si la selección de espermatozoides bajo la óptica del MSOME mejora los resultados tras un ciclo de IMSI.

Material y Métodos:

Se estudiaron de forma retrospectiva 245 ciclos de ovodonación realizados en nuestro centro durante el año 2009. Las muestras seminales utilizadas fueron analizadas siguiendo los criterios de la OMS. Se evaluó la concentración, la motilidad, y la morfología. En todos los casos se encontraban afectados, al menos los parámetros de motilidad y morfología. En 119 ciclos se realizó IMSI, en los 126 ciclos restantes ICSI.

Se comparó tasa de fecundación, calidad embrionaria (tipo A+B), número de embriones transferidos y tasa de implantación, gestación y aborto en ambos grupos.



(A) y (B) selección de espermatozoides a 400x y 2200x respectivamente. (C) Visualización de vacuolas en un pool de espermatozoides.

Porcentaje de muestras con teratozoospermia utilizadas considerando la procedencia (congelada y fresca) y la motilidad y concentración.

	Congelada	Fresca
Grupo IMSI	81 (68%)	38(32%)
Grupo ICSI	92(73%)	34(27%)

	Astenoterato	Oligoastenoterato
Grupo IMSI	15(39%)	23(61%)
Grupo ICSI	14(41%)	20(59%)

	Astenoterato	Oligoastenoterato
Grupo IMSI	48(59%)	33(41%)
Grupo ICSI	52(56%)	40(44%)

Estudio comparativo entre IMSI e ICSI

	Grupo IMSI (n=119)	Grupo ICSI (n=126)
Inseminadas	1452	1508
Fecundadas	62% (926)	60% (908)
Categorías A+B	54%	58%
Embriones transferidos	225	228
Implantados	36% (82) *	25% (58) *
Gestaciones	55% (63) *	38% (45) *
Abortos	21% (13)	16% (7)

Diferentes superficies indican diferencias significativas entre columnas (p<0.05).

Resultados:

➤ No se encontraron diferencias significativas entre la utilización de muestras congeladas y/o frescas entre ambos grupos. De igual modo, tampoco las hubo al comparar la calidad seminal utilizada entre los dos grupos.

➤ No hubo diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los parámetros estudiados: tasa de fecundación, calidades embrionarias (tipo A+B), número de embriones transferidos, y tasa de aborto.

➤ Se observaron diferencias significativas entre las tasa de implantación (36% en el grupo IMSI vs 25% del grupo ICSI; p<0.05), al igual que en la tasa de gestación (55% en grupo IMSI vs 38% en grupo ICSI; p<0.05).

Conclusiones:

Nuestros datos sugieren que las diferencias obtenidas entre IMSI e ICSI no están influenciadas ni por la procedencia de la muestra, (congelada o fresca), ni por los parámetros de motilidad y concentración. Sin embargo, al igual que otros autores (2, 3), sí relacionamos una mala morfología espermática, así como la presencia de vacuolas, con bajas tasas de implantación y gestación clínica.

Conseguir embriones que sean capaces de superar la ventana de implantación y aumentar los embarazos, minimizando los riesgos, es uno de los objetivos de los laboratorios de FIV. Con este estudio concluimos que la introducción del IMSI en nuestro laboratorio ha supuesto un aumento de dichas tasas cuando trabajamos con muestras teratozoospermicas.

Referencias:

- (1) Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F et al. 2002. Real-Time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. Journal of Andrology 23, 1-8.
- (2) Berkovitz A, Eltes F, Lederman H et al. 2006b. How to improve IVF-ICSI outcomes by sperm selection. Reproductive BioMedicine Online 12, 634-638.
- (3) Berkovitz A, Eltes F, Yaari S et al. 2006a. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcomes? Human Reproduction 21, 1787-1790.