



ARTÍCULO DE REVISIÓN

## INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE (ICSI). UNA TÉCNICA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA CON INDICACIONES

INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI). AN ASSISTED REPRODUCTION TECHNOLOGY WITH INDICATIONS

*Cecilia Hernandez Leal, M.D.\**

### RESUMEN

La inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) ha permitido resolver problemas masculinos severos con excelentes resultados. Sin embargo, la difusión de su técnica llevó a la aplicación en casos donde no existe una indicación clara, desplazando muchas veces a la fertilización in vitro (FIV) sin suficientes argumentos. Esta revisión pretende, partiendo de conceptos fisiológicos de fecundación, llamar la atención sobre los eventos involucrados en el ICSI que transgreden dicha fisiología y constituyen grandes enigmas en cuanto a sus implicaciones en el desarrollo futuro. Las diversas observaciones descritas por los grupos de investigación básica dedicados a estos análisis, si bien no establecen un efecto indeseable inherente a la técnica, dejan abierta la investigación y permiten concluir que el ICSI es una técnica con claras indicaciones que no debe utilizarse indiscriminadamente.

**Palabras clave:** ICSI, FIV, reproducción asistida, fecundación.

### SUMMARY

The intracytoplasmic sperm injection (ICSI) from its introduction in humans has let to treat severe male infertility with great results. However, the diffusion of this technology has led to its application in several cases without a clear indication, displacing in many cases the in vitro fertilization (FIV), without enough reasons. This review looks for calling the attention in the physiology of fertilization, recalls the events involved in ICSI which transgress the principles of this physiology and are great enigmas about future development implications. The different findings described by the basic research groups in this area, if they do not give a relation between the ICSI technology and any undesirable effect, they leave the investigation opened and let us conclude that ICSI is an assisted reproductive technology with clear indications and should not be used so widely.

**Key Words:** ICSI, FIV, assisted reproductive technologies, fertilization.

A partir de 1992, con la introducción de la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI), se inició una nueva era en la medicina reproductiva que hizo posible el manejo de parejas con factor masculino severo. Sin embargo, con

\* Médico Gineco-Obstetra. Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario. Bogotá. Colombia.

la difusión y el dominio del ICSI y con la idea de disminuir al máximo las fallas de fecundación por medio de la fertilización *in vitro* (FIV), muchos centros de fertilidad han optado por considerar a la ICSI como la técnica de elección, incluso cuando no existen indicaciones claras para su uso. Es importante considerar que, a pesar de una década desde la introducción de la técnica, todavía no existe información suficiente que respalde su utilización en forma indiscriminada.

Varios grupos de investigación continúan estudiando los efectos y las alteraciones del ICSI, en relación con los mecanismos fisiológicos de fecundación humana y sus posibles implicaciones.<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6</sup>

Esta revisión presenta las bases fisiológicas del proceso de fecundación humana, para tomarlas como punto de referencia en el momento de describir los cambios que se suceden en el ICSI. No obstante, aún existen grandes enigmas en relación con la forma como evolucionan los embriones concebidos por esta técnica.

## FECUNDACIÓN

La fecundación humana constituye un proceso perfectamente coordinado de múltiples pasos, que involucra tanto la interacción del espermatozoide con los recubrimientos ovocitarios, como la penetración espermática a través de dichas estructuras y la fusión de las membranas plasmáticas ovocitaria y espermática, para culminar con la activación del ovocito.

### Interacción espermatozoide-cumulus y zona pelúcida

Los espermatozoides antes de encontrarse en condiciones para fecundar, deben residir durante un periodo mínimo en el tracto genital femenino, en un proceso denominado capacitación. Este permite la hiperactivación y remoción de glicoproteínas de la superficie espermática, exponiendo los receptores adecuados para recibir señales procedentes del ovocito.

Dentro de las células del cúmulus ovocitario se inicia el proceso de reacción acrosómica espermática, que implica la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, permitiendo la liberación de enzimas hidrolíticas por parte del acrosoma espermático.

Dentro del cúmulus los espermatozoides en su mayoría ya experimentaron la reacción acrosómica y completan este proceso cuando ingresan en la zona pelúcida.<sup>7</sup>

Tanto la capacitación como la reacción acrosómica son eventos que pueden ser reproducidos *in vitro*, en ausencia de señales femeninas.

La reacción acrosómica es un requisito crítico para la interacción de membranas de los gametos y no sólo permite el acceso del espermatozoide al espacio perivitelino sino que también expone y modifica regiones de la superficie espermática que facilitan su interacción.

La zona pelúcida ovocitaria contiene glicoproteínas denominadas ZP 1, ZP 2 y ZP 3, que funcionan como receptores e intervienen en la interacción enzima-sustrato con el espermatozoide.

La unión inicial de membranas lleva a una firme adhesión célula-célula y termina con la fusión para formar una sola.<sup>8</sup>

### Activación ovocitaria

Una vez se fusionan las membranas de los gametos, se desencadena una señal de transducción llamada activación ovocitaria que conlleva eventos morfológicos y bioquímicos, algunos de los cuales suceden en segundos o minutos y otros en el curso de horas.

Uno de los cambios más tempranos es el incremento en los niveles de calcio intracelular, los cuales oscilan en forma repetida durante un periodo de varias horas después de la fusión de membranas. La elevación del calcio intracelular ocasiona exocitosis de gránulos corticales, estructuras

ubicadas por debajo de la membrana plasmática ovocitaria que al liberar su contenido enzimático al espacio perivitelino, modifican la zona pelúcida impidiendo el ingreso de otro espermatozoide. Este es uno de los principales mecanismos implicados en el control de la polispermia en humanos.<sup>9</sup>

Otro componente crítico de la activación ovocitaria es el reinicio de la segunda meiosis que implica el ingreso al ciclo celular.

La detención del ciclo celular está marcada por la actividad coordinada de kinasas. Antes de ser fecundados, los ovocitos maduros detienen su ciclo en la segunda meiosis, gracias al dominio de moléculas como: MPF (factor promotor de la maduración) y MAP (proteína mitógeno activada).

Poco después de la fusión de gametos y el aumento del calcio intracelular, se produce la inactivación del MPF y la disminución del MAP, lo cual representa la señal necesaria para continuar el ciclo celular, fenómeno evidente desde el punto de vista morfológico por la extrusión del segundo cuerpo polar. En el plano funcional se caracteriza por la capacidad para ensamblar el huso meiótico, la condensación de cromatina ovocitaria, la ruptura de la membrana nuclear y la formación de las membranas de los pronúcleos.<sup>10</sup>

### **Incorporación del espermatozoide al ooplasma**

El contacto inicial de la cabeza espermática con la membrana plasmática ovocitaria ocurre a través de la membrana acrosomal interna expuesta después de la reacción acrosómica, seguida por el segmento ecuatorial y la parte posterior de la cabeza.

Los movimientos del flagelo espermático disminuyen y se detienen pocos segundos después de la fusión de membranas. Hallazgos en microscopía electrónica muestran que la membrana acrosomal interna se degrada en la membrana ovocitaria siguiendo un proceso similar a la fagocitosis.

La teca perinuclear, estructura única del citoesqueleto espermático, ubicada entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear, es fundamental para la espermiogénesis y la estabilización de estructuras espermáticas, tal como se ha demostrado mediante inmunofluorescencia de ovocitos humanos inseminados y análisis seriado ultraestructural.

Tales observaciones ponen de manifiesto que la remoción del núcleo espermático después de la pérdida de la membrana plasmática y la interacción con la superficie ovocitaria, es un fenómeno que involucra microvellosidades ovocitarias ricas en microfilamentos de actina. La desaparición de la teca perinuclear constituye un evento temprano en la fecundación en humanos, indispensable para la conversión del núcleo espermático en el pronúcleo masculino.<sup>11</sup>

Una vez el espermatozoide ingresa con su flagelo y desprovisto del acrosoma comienza a sufrir cambios en el ooplasma. En la cabeza, después de la ruptura de la membrana nuclear, la cromatina condensada desde la espermatogénesis es descondensada por intercambio de proteínas de empaque (protaminas por histonas), proceso inducido por el citoplasma ovocitario que proporciona las histonas necesarias para el intercambio, junto con enzimas que promueven la ruptura de uniones bisulfuro.

A nivel de la pieza intermedia espermática se encuentra una estructura fundamental que es incorporada al ooplasma: el centríolo distal. Este se duplicará haciendo uso del material pericentriolar ovocitario, dando origen al centrosoma del cigoto, una estructura que dirigirá posteriormente el desarrollo de pronúcleos y la formación del primer huso mitótico.<sup>12</sup>

Cuando el flagelo espermático ingresa al ovocito disocia sus mitocondrias, las cuales vienen marcadas con proteínas llamadas ubicuitinas desde la espermatogénesis. A través de ellas son re-

conocidas y degradadas en el ooplasma, a través de un proceso mediado por proteosomas. De la misma forma también es degradada la vaina fibrosa. Así, la mayoría de estructuras remanentes del flagelo desaparecen rápidamente después de su incorporación.<sup>13</sup>

Varias horas después de la fusión de gametos, las oscilaciones de calcio cesan, se forman los pronúcleos femenino y masculino, y comienza la síntesis de ADN. Así culmina el proceso de la fecundación y se inicia la transición del genoma materno hacia la activación del genoma embrionario.

## FECUNDACION EN ICSI

El proceso de fecundación en ICSI implica una serie de cambios en los mecanismos fisiológicos descritos *in vivo* e *in vitro*, que comienzan desde implicaciones técnicas hasta la abreviación de los pasos descritos en la interacción de gametos y su consecuencia en los eventos conducentes a la formación de pronúcleos.

## CONSIDERACIONES GENERALES

### Selección del espermatozoide

Esta selección es arbitraria y al azar, realizada por quien lleva a cabo la técnica y basada fundamentalmente en la observación de movimiento y morfología espermáticos y no en su competencia natural.

En segundo lugar, el proceso de selección y captura del espermatozoide que será inyectado supone la exposición a estímulos físicos y químicos no fisiológicos, como el trauma sobre el flagelo para su inmovilización, la luz del microscopio y medios de cultivo especiales que frenan su movimiento.<sup>12</sup>

### Determinación del lugar de inyección

El ovocito antes de ser inyectado se somete a una manipulación enzimática y mecánica para ser

desprovisto de las células del cúmulus e identificar su estado de madurez y la ubicación del primer cuerpo polar.

La descripción de la técnica del ICSI exige tomar como punto de referencia para ubicar el huso meiótico ovocitario, el lugar donde se encuentra el primer cuerpo polar. Esta recomendación busca evitar la inyección del espermatozoide sobre el huso, previniendo daños sobre tal estructura. Sin embargo, en ocasiones la manipulación ovocitaria previa puede desplazar la ubicación original del cuerpo polar y alterar su relación con el huso, haciendo que esta precaución no sea suficiente para evitar inyección esta eventualidad.<sup>12</sup>

### ADN exógeno unido a la superficie espermática

Se sugiere la posibilidad de incorporar con la inyección del espermatozoide íntegro, ADN exógeno adherido a la superficie, situación que es evitada *in vivo* e *in vitro* en el proceso de interacción de membranas.<sup>12</sup>

## EVENTOS CELULARES EN OVOCITOS FECUNDADOS POR ICSI VERSUS FIV

En ICSI una vez se selecciona el espermatozoide en la pipeta de microinyección es colocado directamente en el interior del ovocito, atravesando en un solo paso las envolturas de la célula materna e introduciendo el espermatozoide íntegro, con el acrosoma y su contenido intactos y la teca perinuclear al ooplasma.<sup>12</sup> Esta maniobra de inyección sustituye los pasos descritos de interacción entre gametos, como reacción acrosómica, unión del espermatozoide a la zona pelúcida, penetración e interacción de membranas ovocitaria y espermática.<sup>4</sup>

La activación ovocitaria que se observa en la ICSI, sugiere que ciertos componentes espermáticos pueden desencadenarla, aun en ausencia

de interacciones de membrana. Sin embargo, existen diferencias en los eventos de activación cuando se comparan con los descritos en FIV. Una de ellas es el inicio de las oscilaciones de calcio, retrasado de 30 minutos a varias horas.<sup>1</sup> Este hallazgo es consistente con la observación de otros eventos como emisión del segundo cuerpo polar y formación pronuclear, altamente variables entre ovocitos que son inyectados en momentos similares.

El retraso puede ser explicado por el mayor tiempo requerido para romper la membrana plasmática del espermatozoide y remover el acrosoma para exponer el factor espermático activador del ovocito presente dentro de la teca perinuclear. Modelos animales empleando ratones, diseñados para investigar los efectos fisiológicos del retraso en la activación ovocitaria en ICSI, sugieren que existe una disminución en la capacidad reproductiva y longevidad de la descendencia resultante.<sup>14</sup>

Estudios que realizan FIV e ICSI en ovocitos de hámster libres de zona pelúcida con espermatozoides humanos<sup>15</sup> y estudios de FIV e ICSI en monos rhesus<sup>4,13</sup> han permitido la observación constante de eventos de fecundación específicos del ICSI. Tales trabajos están basados en la observación de estructuras espermáticas (teca perinuclear, ADN y mitocondrias del flagelo) y ovocitarias (ADN y microtúbulos), marcadas por técnicas de fluorescencia en diferentes momentos de la fecundación.

Las anteriores observaciones permitieron encontrar diferencias de la fecundación por ICSI en relación con FIV, en cuanto a degradación de estructuras de membrana espermática, descondensación de ADN, inicio de síntesis de ADN y formación de pronúcleos.

La descondensación del ADN espermático ocurre asincrónicamente después del ICSI, comenzando desde la porción basal de la cabeza hasta el segmento apical cubierto por la teca perinuclear.

La formación del aster espermático a partir del centrosoma, la organización microtubular y la apo-

sición pronuclear después del ICSI se llevan a cabo a pesar de no haber logrado una descondensación completa del ADN.

Señales correspondientes a la teca perinuclear pueden encontrarse en el ápex de la cabeza, incluso después de la aposición pronuclear 12 horas después de la inyección, momento en que en FIV ha ocurrido una descondensación completa del ADN. De hecho, es posible detectar restos de la teca perinuclear 20 a 24 horas después del procedimiento de ICSI. De igual manera, el acrosoma fue encontrado casi intacto a lo largo de las observaciones.

La presencia de cromosomas sexuales en la región apical de la cabeza espermática, lugar donde el proceso de descondensación es retrasado, puede relacionarse con el incremento en la tasa de alteraciones cromosómicas sexuales sugerido en recién nacidos de ICSI.<sup>16</sup>

La síntesis de ADN en ICSI se inicia sólo cuando el espermatozoide completa su descondensación y parece ocurrir de manera sincrónica en ambos pronúcleos. Esto representa un retraso cuando se compara con cigotos obtenidos por técnicas de FIV.

De otro lado, los gránulos corticales que normalmente sufren excitosis después de la activación ovocitaria, pueden ser retenidos dentro del citoplasma después del ICSI. Aunque son eventualmente degradados o perdidos, se desconoce si la retención de tales residuos puede ocasionar efectos posteriores en el desarrollo. Igualmente, es incierto el efecto que tiene el ingreso del contenido acrosómico en el citoplasma ovocitario.

## EFFECTOS DE ICSI VERSUS FIV EN RESULTADOS

Dada la tendencia al incremento en ciclos de ICSI con respecto a FIV y a las publicaciones que sugieren la realización de esta técnica en todos los casos de concepción *in vitro*, independiente de su etiología, surgen inquietudes sobre los riesgos potenciales para los embriones y cómo será su desarrollo futuro.

Sólo cuando se analizan de manera cuidadosa las tasas de fecundación, de implantación y de embarazo, entre otras, es posible realizar debates conducentes a respaldar una posición frente a tales interrogantes.

La mayoría de publicaciones hacen referencia al ICSI como un procedimiento seguro, afirmación apoyada en las altas tasas de fecundación y embarazo y en la incidencia de malformaciones congénitas mayores y menores comparables a las obtenidas en FIV.<sup>17,18</sup> De otro lado, aunque es llamativo el hallazgo de un ligero incremento en la incidencia de alteraciones cromosómicas *de novo* en nacidos de ICSI, su causa no ha sido completamente aclarada y no existen argumentos suficientes para establecer una relación de causa efecto inherente a la técnica.

En estudios que observan la capacidad de progresión de los embriones al estado de blastocisto según su origen en FIV o ICSI, se informa una disminución significativa en este potencial en embriones para ICSI, al igual que un menor porcentaje de *hatching* embrionario en este grupo.<sup>19, 20</sup> Sin embargo, también se observa una tendencia no significativa hacia mejores tasas de implantación en día 2 ó 3 para embriones de ICSI.

De otro lado, investigando la sugerencia del ICSI como posible tratamiento de elección para todos los casos de concepción *in vitro*, se reafirma su indicación en factores masculinos severos y se plantea que en ausencia de esta etiología, las tasas de fertilización son comparables con las de FIV.<sup>21, 22</sup>

Considerando el análisis de costo-beneficio en el uso del ICSI como técnica de elección rutinaria, se encuentra un incremento en costo-efectividad y costo necesario para tratar.<sup>23</sup>

En conclusión, es claro que no hay datos suficientes para sugerir el ICSI como técnica de elección en todos los casos de concepción *in vitro*, como también es clara su gran utilidad en la resolución de alteraciones espermáticas severas y en casos con antecedente de falla de fertilización.

La ICSI desde su introducción en mamíferos en 1976,<sup>24</sup> ha sido utilizado en muchas especies hasta su aplicación en humanos, resolviendo a lo largo de su implementación muchos interrogantes relacionados con los mecanismos de fecundación que involucra. Por eso constituye hoy en día un tratamiento razonablemente seguro y efectivo. Sin embargo, el hecho de carecer de información acerca de los efectos a largo plazo que tienen los hallazgos descritos a nivel celular, junto con el desconocimiento de otros factores y sus implicaciones moleculares, nos obliga a considerar al ICSI como una técnica con indicaciones precisas, acerca de la cual nos falta mucho por descubrir.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Tesarik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1994; 9: 511-518.
2. Nagy ZP, Liu J, Joris H. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1994; 9: 1743-1748.
3. Nakano Y, Shirakawa H, Mitsuhashi N. Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the mouse egg injected with a spermatozoon. Mol Hum Reprod. 1997; 3: 1087-1093.
4. Ramalho-Santos J, Sotovsky P, Simerly C, Oko R. ICSI choreography: fate of sperm structures after monospermic rhesus ICSI and first cell cycle implications. Human Reprod. 2000; 15 (12): 2610-2620.
5. Yanagida K, Katayose H, Hirata S. Influence of sperm immobilization on onset of Ca oscillations after ICSI. Hum Reprod. 2001; 16: 148-152.
6. Williams CJ. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. Human Reprod Update. 2002; 8 (4): 313-321.
7. Dale B, Elder K. IVF. 1997. Cambridge University Press: 15-53.
8. Evans JP. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. Hum Reprod Update. 2002; 8 (4): 297-311.

9. Yanagimachi R. The physiology of reproduction. Mammalian fertilization. In Knobil, E. and Neill JD. Eds. Raven Press Ltd. New York, USA: 189-317.
10. Schultz RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update*. 2002; 8 (4): 323-331.
11. Sutovsky P, Oko R, Hewitson L, Schatten G. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with bovine oocyte surface during fertilization. *Dev Biol*. 1997; 188 (1): 75-84.
12. Schatten G. Cytoskeletal aspects of Assisted fertilization. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2000; 18 (2): 151-159.
13. Sutovsky P, Hewitson L, Simerly CR. Intracytoplasmic sperm injection for rhesus monkey fertilization results in unusual chromatin, cytoskeletal and membrane events, but eventually leads to pronuclear development and sperm aster assembly. *Human Reprod*. 1996; 11: 1703-1712.
14. Tarin JJ, Perez-Albala S, Aguilar A, Minarro J, Cano A. Long-term effects of posovulatory aging of mouse oocytes on offspring: a two-generational study. *Biol Reprod*. 1999; 61: 1347-1355.
15. Terada Y, Luetjens CM, Sutovsky P, Schatten G. Atypical decondensation of the sperm nucleus, delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic human sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: Does itself introduce chromosomal anomalies? *Fertil Steril*. 2000; 74 (3): 454-460.
16. Bonduelle M, Wilikens A. A follow up study of children born after ICSI with epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod*. 1998; 13 (1): 196-207.
17. Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A. Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod*. 1996; 11 (4): 131-155.
18. Tarlatzis BC, Bili H. Survey on intracytoplasmic sperm injection: report from the ESHRE ICSI Task Force. *Human Reprod*. 1998; 13 (Suppl 1): 165-177.
19. Griffiths TA, Murdoch AP, Herbert M. Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure. *Hum Reprod*. 2000; 15 (7): 1592-1596.
20. Dumoulin JCM, Coonen E., Bras M. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 2000; 15 (2): 402-409.
21. Fishel S, Aslam I, Lisi F. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? *Hum Reprod*. 2000; 15 (6): 1278-1283.
22. Oehninger S, Gosden RG. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? *Hum Reprod*. 2002; 17 (9): 2237-2242.
23. Ola B., Afnan M, Sharif K. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? *Hum Reprod*. 2001; 16 (12): 2485-2490.
24. Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod*. 1976; 15: 467-470.