

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
en
Biología y Tecnología Aplicada a la
Reproducción Humana Asistida

**Vacuolas en gametos y embriones:
revisión y actualización**

Autor: Raquel Azagra Aparicio

Tutor: Raquel Herrer Saura

Cotutor: Emma Muñoz Saez

Alcobendas, Septiembre 2023

1. Resumen.....	3
2. Palabras clave.....	3
3. Abstract	4
4. Key words	4
5. Introducción	5
6. Objetivos	6
7. Material y métodos.....	6
8. Resultados	6
8.1. Vacuolas en el espermatozoide.....	6
8.1.1. Tasas de laboratorio FIV	11
8.1.2. Tasas clínicas	13
8.2. Vacuolas en ovocitos	14
8.2.1. Tasas de laboratorio FIV	15
8.2.2. Tasas clínicas	16
8.3. Vacuolización espontánea en desarrollo embrionario	17
8.3.1. Tasas de laboratorio FIV	18
8.3.2. Tasas clínicas	21
9. Discusión.....	25
9.1. Vacuolas en espermatozoides	25
9.2. Vacuolas en ovocitos	26
9.3. Vacuolas en desarrollo embrionario	27
10. Conclusiones	30
11. Bibliografía.....	32

1. Resumen

La selección de los mejores gametos y embriones está relacionada con un mayor éxito en las técnicas de reproducción asistida. El objetivo de este trabajo es evaluar la repercusión de las vacuolas en los gametos masculino y femenino en los resultados de laboratorio y en las tasas clínicas, así como valorar el impacto de la vacuolización espontánea durante el desarrollo embrionario a blastocisto y su influencia en las tasas clínicas.

Gracias al MSOME (motile sperm organellar morphology examination) podemos clasificar los espermatozoides según el número y tamaño de las vacuolas. Estas no parecen afectar a la tasa de fecundación y desarrollo embrionario de día 3. Sin embargo, se obtienen unas menores tasas de desarrollo a blastocisto y tasas clínicas cuando se microinyectan espermatozoides tipo III y IV.

Las vacuolas en los ovocitos suponen un mayor fallo de fecundación cuando estas son superiores a los 14µm de diámetro. En general, la presencia de vacuolas afecta negativamente a las tasas de gestación, implantación y aborto.

La vacuolización espontánea en el desarrollo embrionario aparece con más frecuencia en el día 4, produciendo una disminución en la tasa de desarrollo a blastocisto. La localización de estas vacuolas está ubicada mayoritariamente en el trofoectodermo.

2. Palabras clave

Vacuolas, espermatozoides, ovocitos, blastocistos, resultados de laboratorio y tasas clínicas.

3. Abstract

The selection of the best gametes and embryos is related to greater success in assisted reproductive techniques. The objective of this work is to evaluate the impact of vacuoles in male and female gametes on laboratory results and clinical rates. Additionally, assess the impact of spontaneous vacuolization during embryonic development for blastocyst development and its influence on clinical rates.

Thanks to MSOME (motile sperm organellar morphology examination) we can classify sperm according to the number and size of the vacuoles. These do not seem to affect the rate of fertilization and embryo development on day 3. However, lower blastocyst development rates and clinical rates are obtained when type III and IV sperm are microinjected.

The vacuoles in the oocytes represent a greater fertilization failure when they are greater than 14 μ m in diameter. In general, the presence of vacuoles negatively affects pregnancy, implantation, and abortion rates.

Spontaneous vacuolization in embryo development appears more frequently on day 4, producing a decrease in the rate of development to blastocyst. The location of these vacuoles is mainly located in the trophectoderm.

4. Key words

Vacuoles, sperm, oocyte, blastocysts, laboratory results and clinical outcomes

5. Introducción

La evaluación y selección de los mejores embriones para la transferencia es una de las tareas más importantes del embriólogo clínico dentro de las técnicas de Fecundación In Vitro (FIV). En los últimos años, ha habido varios sistemas de evaluación: la evaluación morfológica, la evaluación metabolómica y la evaluación morfocinética con sistemas time lapse. Entre ellos, la evaluación morfológica ha sido el más utilizado (Yu et al., 2018). A lo largo del tiempo, cada vez hay más consenso en la comunidad científica en cuanto a los criterios de selección utilizados. Sin embargo, la subjetividad del embriólogo es un hándicap a tener en cuenta. Por esta razón, existe la necesidad de mejorar la eficacia del método. En este sentido, la introducción de la Inteligencia Artificial en los modelos de selección embrionaria ha supuesto un gran avance a la hora de estandarizar criterios.

La importancia de la selección de gametos y embriones se relaciona con las tasas de éxito de los tratamientos FIV. Así la tasa de embarazo está relacionada con la calidad del blastocisto: se ha reportado que transferencias de dos blastocistos presentan una tasa de gestación del 86,8% cuando ambos son de buena calidad, que disminuye al 69,6% cuando al menos uno de los dos es de calidad óptima, y al 43.8% cuando los dos blastocistos son de calidad subóptima (Yu et al., 2018). Gracias a la transferencia electiva de un solo blastocisto se obtienen tasas más altas de implantación y embarazo y se reduce el riesgo de gestaciones múltiples.

El número de células, la fragmentación y la simetría celular son los criterios de selección fundamentales para embriones tempranos; y la Masa Celular Interna (Mci) y el Trofoectodermo (TF), así como el grado de expansión, para los blastocistos (ASEBIR). Pero hay otros parámetros secundarios que no se han podido observar bien hasta ahora. La introducción de los sistemas time-lapse ha permitido evaluar características cinético-dependientes, que antes era imposible considerar, como la presencia o aparición de vacuolas, especialmente en los embriones. Este trabajo pretende realizar una revisión y actualización de cómo puede afectar este parámetro al desarrollo embrionario y a los resultados clínicos.

6. Objetivos

Este trabajo consta de tres objetivos principales:

- I. Valorar la repercusión de las vacuolas en los gametos femenino y masculino en cuanto a las tasas de fecundación y tasas de desarrollo a blastocisto.
- II. Evaluar el impacto de la vacuolización espontánea durante el desarrollo embrionario para las tasas de desarrollo a blastocisto.
- III. Determinar la influencia de las vacuolas de gametos y embriones en las tasas clínicas.

7. Material y métodos

Con el fin de obtener la información necesaria sobre la influencia de las vacuolas en los gametos y en los embriones, se realizó una búsqueda de artículos científicos en la base de datos PubMed. Se realizó mediante la palabra clave vacuola, usando el operador AND para buscar los artículos que contuviesen también las palabras gametos, espermatozoides, óvulos y embriones. Los artículos fueron seleccionados por su importancia en el tema y con la intención de valorar el impacto que tienen las vacuolas sobre las tasas clínicas.

8. Resultados

8.1. Vacuolas en el espermatozoide

La microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en las técnicas de reproducción asistida, ha permitido a parejas con valores alterados del espermograma que puedan concebir, ya que en su caso de forma natural o mediante la fecundación in vitro convencional no hubiera sido posible.

El efecto de la morfología de los espermatozoides en los resultados del ICSI es un tema de debate. En 2001 se introdujo una técnica con la que poder observar los espermatozoides a un aumento mucho mayor (6000x). Con el **MSOME** (motile sperm organelle morphology examination) es posible examinar la integridad morfológica de los espermatozoides a nivel subcelular (Setti et al., 2014). Esta técnica permite observar ciertas estructuras como las vacuolas, que no son visibles con un aumento similar al ICSI.

La microinyección de espermatozoides derivada de la selección morfológica a grandes aumentos se denomina IMSI (Intracytoplasmic Morphologically selected Sperm Injection).

La vacuola espermática es una concavidad que se extiende desde la superficie de la cabeza del espermatozoide a través del acrosoma hasta el núcleo (Setti et al., 2013). Se ha sugerido que las vacuolas espermáticas se producen durante la condensación nuclear espermática (Setti et al., 2013).

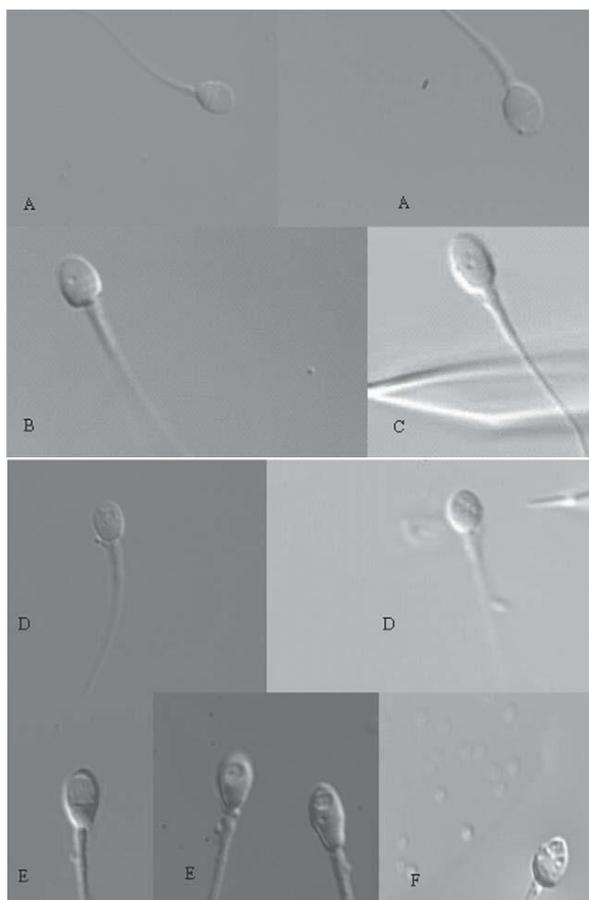
Las vacuolas en la cabeza del espermatozoide pueden variar en tamaño. Se definen como vacuolas pequeñas aquellas que ocupan menos de un 4% del área de la cabeza (Vanderzwalmen et al., 2008) y vacuola grande como las que ocupan más de un 13% del área de la cabeza (Setti et al., 2014). A estas últimas se las conoce como espermatozoides con LNV, vacuolas nucleares grandes.

Tal y como se muestra en la figura 1, uno de los criterios más empleados para clasificar los espermatozoides con vacuolas es el siguiente (Vanderzwalmen et al., 2008):

- Grado I: corresponde a los espermatozoides con ausencia de vacuolas.
- Grado II: son espermatozoides con presencia de dos vacuolas pequeñas como máximo.
- Grado III: en este apartado corresponden tanto espermatozoides con más de dos vacuolas pequeñas como aquellos que tienen al menos una vacuola grande.
- Grado IV: se trata de espermatozoides con vacuolas grandes y otras anomalías morfológicas.

Figura 1

Clasificación de los espermatozoides con vacuolas



Nota. Clasificación de vacuolas: espermatozoides sin vacuolas (A), dos o menos vacuolas por cabeza (B, C), más de dos vacuolas pequeñas (D), al menos una vacuola grande (E, F). (Vanderzwalmen et al., 2008)

La presencia de vacuolas en los espermatozoides es muy común. El porcentaje de espermatozoides con vacuolas en pacientes normozoospermicos es de más de un 90% (Tanaka et al., 2012). El grupo de Vanderzwalmen describen que solo el 7% de todos los espermatozoides que ellos seleccionaron estaban completamente libres de anomalías (Vanderzwalmen et al., 2008). Incluso el porcentaje de incidencia en pacientes astenozoospermicos y oligozoospermicos es muy similar, sin diferencias significativas respecto a los pacientes normozoospermicos (Tanaka et al., 2012).

El porcentaje de espermatozoides con múltiples vacuolas pequeñas se sitúa entre el 27,3% al 49,3% (Boitrelle et al., 2013). La tasa de incidencia de vacuolas grandes se encuentra entre el 24,2% (Setti et al., 2013) y el 25,20% (Setti, et al., 2014). En pacientes normozoospermicos, se observa mayor porcentaje de espermatozoides I y II ($14,10 \pm 7,01\%$) y menor porcentaje de espermatozoides tipo IV ($80,07 \pm 8,58\%$) que en los grupos con alteraciones de la calidad seminal. Se puede apreciar, además, una disminución del

porcentaje de espermatozoides I y II con el aumento de la gravedad de la clasificación seminal según criterio clásico de la OMS, tal y como se observa en la tabla 1 (Zanetti et al., 2018).

La calidad seminal también se encuentra relacionada con los grados MSOME de los espermatozoides. Los parámetros seminales de concentración, recuento total de espermatozoides, movilidad total, movilidad progresiva y morfología se correlacionan positivamente con los grados I/II y negativamente con el grado IV (Zanetti et al., (2018). Estos resultados son corroborados por el grupo de Boitrelle, que exponen una asociación entre la baja movilidad progresiva de la astenozoospermia con una baja proporción de espermatozoides grado I y una alta proporción de grado III (Boitrelle et al., 2013). Por otro lado, en el estudio de Setti, se estudió la correlación entre los parámetros seminales y la incidencia de LNV (Setti, et al., 2013). Obtuvieron una correlación directa con los espermatozoides inmóviles y una correlación inversa con el recuento total de espermatozoides y el porcentaje de movilidad progresiva, tanto antes como después de la preparación de la muestra mediante gradiente de densidad.

Tabla 1

Análisis de la morfología de los espermatozoides en función de la clasificación de infertilidad masculina

Table 1 Descriptive statistics for semen analysis according to male infertility classification

	N	T	AT	OT	OAT	p
Volume (mL)	3.25 ± 1.95 ^a	3.14 ± 1.59 ^b	4.23 ± 3.11 ^a	2.12 ± 1.17 ^c	2.13 ± 1.34 ^c	<0.001
Concentration (× 10 ⁶ /mL)	96.82 ± 47.48 ^a	73.33 ± 49.74 ^b	39.68 ± 22.74 ^c	10.95 ± 12.02 ^d	14.12 ± 19.28 ^d	<0.001
Total sperm count (× 10 ⁶)	298.9 ± 210.6 ^a	214.4 ± 174.7 ^b	155.5 ± 128.4 ^b	16.69 ± 10.83 ^c	17.40 ± 12.94 ^c	<0.001
Total motility (%)	66.21 ± 9.84 ^a	64.17 ± 10.87 ^a	35.75 ± 8.58 ^c	57.79 ± 11.03 ^b	33.17 ± 9.86 ^c	<0.001
Progressive motility (%)	58.05 ± 10.94 ^a	55.71 ± 12.43 ^a	24.66 ± 4.58 ^c	47.44 ± 11.09 ^b	21.95 ± 7.54 ^c	<0.001
Morphology (%)	4.44 ± 0.64 ^a	1.27 ± 1.00 ^b	1.00 ± 1.25 ^c	0.85 ± 0.93 ^c	0.34 ± 0.71 ^c	<0.001
TMSC	179.4 ± 143.0 ^a	123.3 ± 112.7 ^b	38.15 ± 31.14 ^c	8.04 ± 5.66 ^d	4.21 ± 3.40 ^d	<0.001
MSOME I-II (%)	14.10 ± 7.01 ^a	9.46 ± 6.33 ^b	8.93 ± 16.93 ^b	6.92 ± 5.38 ^c	3.95 ± 3.78 ^c	<0.001
MSOME III (%)	5.81 ± 3.74	5.30 ± 3.87	5.27 ± 6.18	5.18 ± 4.44	4.78 ± 4.12	0.911
MSOME IV (%)	80.07 ± 8.58 ^a	85.22 ± 8.41 ^b	87.42 ± 12.24 ^b	87.74 ± 7.74 ^b	91.26 ± 6.81 ^c	<0.001

a≠b≠c≠d (GLM post hoc Tukey $p < 0.05$). N, normozoospermia; T, teratozoospermia; AT, astenoteratozoospermia; OT, oligoteratozoospermia; OAT, oligoastenoteratozoospermia; TMSC, total motile sperm count; MSOME, motile sperm organelle morphology examination.

Nota. N (normozoospermia), T (teratozoospermia), AT (astenoteratozoospermia), TO (oligoteratozoospermia), OAT (oligoastenoteratozoospermia). (Zanetti et al., 2018)

El **origen** de las vacuolas en los espermatozoides aún no está claro, pero se consideran malformaciones nucleares debidas a un mal empaquetamiento del ADN (Fortunato et al., 2016). Según numerosas publicaciones científicas, se ha correlacionado con un aumento en la falta de condensación de cromatina, proceso que tiene lugar durante la

espermiogénesis, es decir, la última etapa de la espermatogénesis, donde se produce la maduración final de los espermatozoides (Boitrelle et al., 2013; Fortunato et al., 2016; Vanderzwalmen et al., 2008). En esta etapa, el ADN se compacta mucho más por acción de las protaminas, que sustituyen a las histonas, consiguiendo un núcleo más denso y pequeño. Estas protaminas hacen que la cromatina se condense hasta 6 veces más que en una célula somática.

Los procesos o modificaciones epigenéticos a nivel de histonas y su reemplazo por las protaminas en el espermatozoide, son muy poco conocidos por la extrema complejidad que tiene diseñar ensayos a nivel experimental que puedan estudiar este aspecto. Pero se sabe que, si la cromatina está correctamente condensada, el 85% del ADN está unido a protaminas y el 15% a histonas (Boitrelle et al., 2013). Para evaluar la condensación de la cromatina en los espermatozoides se puede usar la tinción con azul de anilina. Se trata de una medición indirecta de la proporción de protaminas debido a que se une a las histonas; por lo que una tinción elevada de azul de anilina muestra demuestra un fallo de condensación del ADN, con el que se correlacionan los espermatozoides vacuolados.

Gracias a este ensayo Boitrelle demostró que los espermatozoides sin vacuolas tienen una tasa media significativamente más baja ($p < 0.0001$) de cromatina no condensada (9,3%) con respecto a los espermatozoides con numerosas vacuolas pequeñas (39,8%). Esta tasa sigue siendo menor aun cuando se diferencia entre cromatina parcial o completamente no condensada: los espermatozoides con ausencia de vacuolas presentan un porcentaje más bajo de cromatina completamente no condensada que los espermatozoides con múltiples vacuolas pequeñas (6,7% frente a 18,9%, respectivamente) y de cromatina parcialmente no condensada (2,7% frente a 20,9%, respectivamente) ($p < 0,0001$) (Boitrelle et al., 2013).

Se ha podido observar, en espermatozoides con una vacuola grande (que ocupa más del 15% de la superficie de la cabeza), una concentración de histona H3 estadísticamente superior a la de espermatozoides sin vacuolas (88,1% frente a 74,8%, $p = 0.009$) y una concentración estadísticamente inferior de protamina 2 (50,2% vs 82,1%, $p < 0.001$) (Bendayan et al., 2022).

En algunos estudios, se describe que las vacuolas estaban asociadas a una mayor fragmentación del ADN (Vanderzwalmen et al., 2008), lo que tiene sentido dado que la condensación deficiente de la cromatina puede hacer que el ADN nuclear del esperma sea

más vulnerable al daño mientras viaja a través de los tractos genitales masculinos y femeninos (Boitrelle et al., 2013).

8.1.1. Tasas de laboratorio FIV

Es importante explicar que en la revisión de los artículos se han encontrado dos tipos de metodologías: por un lado, los estudios directos, en los cuales la microinyección de espermatozoides se realiza con el MSOME, conociendo las características del espermatozoide microinyectado en el ovocito. Dentro de este tipo de ensayo tenemos los artículos realizados por Greco, Tanaka y Vanderzwalmen (Greco et al., 2013; Tanaka et al., 2012; Vanderzwalmen et al., 2008). Y, por otro lado, los trabajos indirectos realizados por Setti y Zanetti (Setti et al., 2013, 2014; Zanetti et al., 2018), donde se lleva a cabo el ICSI convencional y se analiza la morfología de la muestra seminal utilizada mediante MSOME. En este tipo de estudios se llevan a cabo análisis de regresión de la correlación de la incidencia de los grados MSOME con los resultados de ICSI.

La **tasa de fecundación** cuando se microinyectan espermatozoides con un máximo de dos vacuolas pequeñas es de 73,7% y de espermatozoides con al menos una vacuola grande o varias pequeñas de un 66,9%, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($p>0.05$) (Greco et al., 2013). Estos datos son corroborados por Vanderzwalmen, el cual tampoco encuentra una diferencia significativa en la tasa de fecundación de espermatozoides grado I/II (89,5%) y grado III/IV (84,6%, $p>0.5$) (Vanderzwalmen et al., 2008). Sin embargo, Tanaka sí encuentra diferencias estadísticas cuando se microinyectan espermatozoides con un máximo de dos vacuolas pequeñas (85,7%) frente a espermatozoides con al menos una vacuola grande (60,9%, $p<0.05$), (Tanaka et al., 2012). Los propios autores afirman que estos resultados no son concluyentes, debido fundamentalmente al escaso tamaño muestral de cada grupo. Tan solo se microinyectan 20 ovocitos con espermatozoides sin vacuolas, 63 con vacuolas pequeñas y 23 con vacuolas grandes. El hecho de que este estudio sí encuentre diferencias significativas también puede deberse a que la categorización del tamaño de las vacuolas es diferente, puesto que en general todas las publicaciones de este tipo presentan un número bajo de casos. En este artículo, las vacuolas grandes son consideradas aquellas que ocupan más de un 50% de la superficie de la cabeza, mientras que las vacuolas pequeñas ocupan $<25\%$.

Respecto a los ensayos indirectos, el grupo de Setti no encuentran ninguna correlación

entre la incidencia de espermatozoides con grandes vacuolas y la tasa de fecundación (Setti et al., 2013, 2014). Zanetti tampoco encuentra correlación con espermatozoides grado IV (Zanetti et al., 2018).

Los estudios directos no encuentran significancia estadística en cuanto a la **tasa de embriones en D3** de desarrollo en función del tipo de vacuola (Greco et al., 2013; Vanderzwalmen et al., 2008); sin embargo, en los análisis de correlación indirectos, obtenemos resultados heterogéneos: por un lado, Zanetti ha encontrado correlaciones significativamente negativas con los espermatozoides con grandes vacuolas (Zanetti et al., 2018); y en cuanto al grupo de Setti, las dos publicaciones que estudia la presencia de vacuolas en espermatozoides, presenta resultados opuestos en cuanto a la tasa de embriones de D3 de buena calidad (Setti et al., 2013, 2014).

En el **desarrollo hasta** la etapa de **blastocisto** es donde se empiezan a encontrar diferencias entre los espermatozoides no vacuolados frente a los vacuolados. Como se puede observar en la tabla 2, la tasa de formación de blastocisto no difiere en cuanto a espermatozoides de grado I y II. Esto no ocurre cuando las vacuolas son grandes o hay más de dos vacuolas pequeñas (grado III), donde sí encuentran unas tasas de formación de blastocisto menores. Si hablamos de blastocistos de buena calidad nos encontramos frente al mismo escenario. Las tasas son muy similares en cuanto a espermatozoides de grado I y II, pero las tasas en espermatozoides grado III y IV disminuyen significativamente. Aunque es cierto que el tamaño muestral de cada grupo es bastante bajo, el grupo de Setti también obtuvieron una correlación negativa entre la tasa de blastocistos y los espermatozoides LNV (Setti et al., 2013). Se puede observar una correlación significativamente positiva de la tasa de formación de blastocistos con los espermatozoides grado I/II (Zanetti et al., 2018).

Para los espermatozoides con LNV, el análisis de regresión de Setti mostró una disminución del 10% en la probabilidad de que un embrión se desarrollara hasta la etapa de blastocisto, una probabilidad menor del 16% de que un blastocisto posea un trofoectodermo normal y una posibilidad reducida del 15% de que un blastocisto tenga una masa celular interna normal. Pero el grado de expansión de los blastocistos no fue influenciado por los espermatozoides LNV o espermatozoides normales (Setti et al., 2014).

Tabla 2

Resultado del desarrollo embrionario según los tipos de espermatozoides microinyectados

Table 1. (a) Outcome of embryo development in a group of 25 patients after sibling oocytes were injected with grade I, grade II, grade III and grade IV spermatozoa. (b) Chi-squared test results.

a					
Type of injected spermatozoa		Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
No. injected oocytes		16	70	59	19
Percentage (no.) of embryos per injected oocyte					
Zygotes		87.5 (14)	90.0 (63)	94.9 (56)	52.6 (10)
Day-3 embryos		87.5 (14)	88.6 (62)	93.2 (55)	47.4 (9)
Good quality day-3 embryos		43.8% (7)	42.9 (30)	33.9 (20)	21.1 (4)
Blastocysts		56.3% (9)	61.4 (43)	5.1 (3)	0 (0)
Good quality blastocysts		37.5% (6)	37.1 (26)	1.7 (1)	0 (0)

b							
Chi-squared-test Grade of spermatozoon	All groups	Multiple comparison analysis (P-values)					
		I versus II	I versus III	I versus IV	II versus III	II versus IV	III versus IV
Injected oocytes versus							
Zygotes	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Day-3 embryos	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Good quality day-3 embryos	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Blastocysts	<0.001	NS	<0.001	0.003	<0.001	0.001	NS
Good quality blastocysts	<0.001	NS	<0.001	NS	<0.001	NS	NS

Significance level $P < 0.009$ after Bonferroni adjustment, NS = not statistically significant.

Nota. A) Resultado del desarrollo embrionario tras ICSI con espermatozoides grado I (ausencia de vacuolas), grado II (máximo de dos vacuolas pequeñas), grado III (más de dos vacuolas pequeñas o al menos una vacuola grande) y grado IV (vacuolas grandes junto con formas anormales de la cabeza u otras anomalías). B) Resultados de la prueba de chi-cuadrado. (Vanderzwalmen et al., 2008)

8.1.2. Tasas clínicas

Tal y como se muestra en la Tabla 3, las **tasas clínicas** se ven influenciadas negativamente por los espermatozoides que presentan vacuolas grado III y IV, cuando se comparan con los tipos I y II (Greco et al., 2013). La transferencia de embriones en este estudio se realiza en el día 3 de desarrollo. Hoy en día se sabe que la transferencia en día 5 es más efectiva en cuanto a las tasas de implantación, ya que el útero se encuentra en su estado óptimo para que se produzca la implantación. Pese a esta limitación, estos datos podrían ser respaldados con las conclusiones de otros estudios que, pese al pequeño tamaño muestral de los blastocistos transferidos, se encuentra que la presencia de vacuolas en los núcleos de los espermatozoides disminuye las tasas de embarazo e implantación (Vanderzwalmen

et al., 2008).

Respecto a los ensayos indirectos, si bien Zanetti no obtuvo resultados significativamente estadísticos respecto a la tasa de implantación (Zanetti et al., 2018), los estudios de Setti obtuvieron una correlación negativa de implantación y embarazo (Setti et al., 2013, 2014).

Tabla 3

Resultados clínicos de espermatozoides de buena y mala calidad

Outcome variable	Group A	Group B	Total
No. of pregnancies: β -hCG+/transfer (pregnancy rate)	28/60 (46.7) ^a	8/35 (22.9) ^a	36/95 (37.0)
No. of clinical pregnancies: pregnancies/transfer (clinical pregnancy rate)	25/60 (41.7) ^a	6/35 (17.1) ^a	31/95 (32.6)
No. of implanted embryos: no. of fetal heartbeats/transferred embryos (implantation rate)	34/147 (23.1) ^a	6/86 (7.0) ^a	40/233 (17.1)
No. of live births: live births/transfer (live-birth rate)	22/60 (36.7) ^a	5/35 (14.3) ^a	27/95 (28.4)

Note: values are number or mean \pm standard deviation (SD) (percentage).
^a Fisher's exact test, $P < .05$.
Greco. Sperm vacuoles and clinical outcomes. *Fertil Steril* 2013.

Nota. Comparación de los resultados clínicos entre espermatozoides de buena (grupo I y II) y mala calidad (grado III y IV). (Greco et al., 2013)

8.2. Vacuolas en ovocitos

La madurez nuclear del ovocito se observa fácilmente mediante la extrusión del primer corpúsculo polar. Para la correcta fecundación de los ovocitos, se necesita que exista una coordinación entre la madurez nuclear y la madurez citoplasmática del mismo. Asincronías o alteraciones en ambos procesos de maduración puede conllevar anomalías morfológicas en los ovocitos (Rienzi et al., 2008).

Los dimorfismos ovocitarios se dividen en anomalías citoplasmáticas (cuerpos refráctiles, aumento de granulidad, cuerpos refringentes y vacuolas) y anomalías extracitoplasmáticas (alteraciones en el tamaño y forma del espacio perivitelino, anormalidad morfológica del primer corpúsculo polar y alteraciones en la zona pelúcida).

Las vacuolas son inclusiones citoplasmáticas rellenas de líquido y rodeadas por una membrana. (Asociación para el estudio de la biología de la reproducción [ASEBIR], 2015). Las vacuolas pueden surgir de manera espontánea o por la fusión de vesículas preexistentes de retículo endoplasmático liso o del aparato de Golgi.

Su tamaño y número varían considerablemente. En la última clasificación ASEBIR, se ha tomado un valor de 14 µm como punto de corte para el diámetro de las vacuolas, puesto que a partir del mismo el riesgo de fallo de fecundación es mayor. (Ebner et al., 2005; Rienzi et al., 2008).

Aproximadamente el 60-70% de los ovocitos tienen uno o más dimorfismos (ASEBIR., 2015). La aparición de una vacuola en el ovocito tiene una tasa de incidencia entre el 3 y el 12%; sin embargo, la presencia de múltiples vacuolas tiene una incidencia del 1% (ASEBIR, 2015).

8.2.1. Tasas de laboratorio FIV

En cuanto a las **tasas de fecundación**, la presencia de una o más vacuolas condujo a una cantidad significativamente menor de cigotos con dos pronúcleos (48,9 %) en ICSI en comparación con los gametos sin vacuolas (65,3 %) ($P < 0.05$). (Ebner et al., 2005). La tasa de fecundación reducida para los ovocitos vacuolados es corroborada por otros estudios (Braga et al., 2023; Rienzi et al., 2008).

Hay otros estudios en los que la tasa de fecundación no se ve afectada. El grupo de Ten no encontró una reducción significativa en gametos vacuolados (61,8%) y gametos no vacuolados (66,9%) (Ten et al., 2007). Sin embargo, Bartolacci realizó una revisión en la cual, de 14 artículos analizados sobre las vacuolas en los ovocitos, 10 de ellos encontraron una correlación negativa en los resultados de fecundación (Bartolacci et al., 2022).

No se encuentran diferencias significativamente estadísticas en cuanto al **desarrollo embrionario** en D2. Como se observa en la tabla 4, el grupo de Ten obtuvieron una tasa de embriones de calidad óptima de día 2 del 21,4% en ovocitos vacuolados y una tasa del 37,6% en ovocitos no vacuolados, aunque la tasa fue menor, no hubo diferencia significativa (Ten et al., 2007).

Tabla 4

Influencia de las vacuolas en la calidad embrionaria

Table 5. Influence of dysmorphisms on embryo quality after intracytoplasmic sperm injection in donor oocyte patients.

	No. of embryos	Good (%) quality ^a	Odds ratio ^b	95% CI	P-value
<i>Perivitelline space</i>					
Normal	974	35.6	1.00		
Large	108	50.0	1.80	1.15–2.80	0.01
<i>Perivitelline debris</i>					
No	634	37.1	1.00		
Yes	448	36.8	1.02	0.74–1.41	NS
<i>Oocyte shape</i>					
Spherical	675	37.3	1.00		
Non-spherical	407	36.4	0.92	0.67–1.26	NS
<i>Zona pellucida integrity</i>					
Normal	786	36.1	1.00		
Abnormal	296	39.2	1.11	0.81–1.53	NS
<i>First polar body</i>					
Normal	192	32.8	1.00		
Fragmented/irregular	890	37.9	1.33	0.85–2.09	NS
<i>Cytoplasmic granularity</i>					
Normal	748	42.5	1.00		
Excessive	334	34.5	0.68	0.46–1.01	NS
<i>Presence of vacuoles</i>					
No	1040	37.6	1.00		
Yes	42	21.4	0.51	0.24–1.09	NS
<i>Cytoplasmic colour</i>					
Normal	1046	37.9	1.00		
Dark	36	8.3	0.17	0.04–0.74	0.02

^a4-cell embryos, <25% of cytoplasmic fragmentation, no blastomere multinucleation, equal or similar blastomeres.

^bOdds ratio adjusted for all variables of the table.

Nota. Influencia de las dismorfias ovocitarias en la calidad de embriones de día 2 tras ICSI. (Ten et al., 2007)

En cuanto a los embriones de ovocitos vacuolados nos encontramos con una menor tasa de embriones de D3 de buena calidad (39% vs 41%, $p < 0.01$) (Braga et al., 2023). Sin embargo, no se han encontrado diferencias en cuanto a la proporción de embriones que llegan a **blastocisto** (53% vs 61%, $p 0.617$).

8.2.2. Tasas clínicas

Las **tasas de éxito** de las técnicas de reproducción asistida también se pueden ver afectadas por la presencia de vacuolas en los gametos femeninos. Estudios realizados con transferencias de blastocistos en D5 de desarrollo han mostrado unas tasas significativamente menores de implantación y de embarazo: en cuanto a las tasas de implantación se observa un 20,5% de ovocitos vacuolados en comparación con un 36,2% en ovocitos no vacuolados ($p < 0.01$) y respecto a las tasas de embarazo se obtiene un 11,1% y un 21% respectivamente ($p < 0.01$). Además, afecta a la tasa de aborto

espontáneo, siendo esta significativamente mayor en los ovocitos vacuolados (11% frente a un 0%, $p < 0.01$) (Braga et al., 2023).

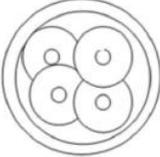
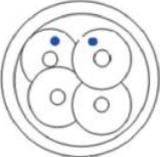
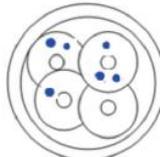
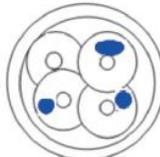
8.3. Vacuolización espontánea en desarrollo embrionario

Las vacuolas son inclusiones citoplasmáticas llenas de líquido del espacio perivitelino (Chen et al., 2022) (Zhang et al., 2019). La vacuolización es el dimorfismo citoplasmático más dinámico, puesto que las vacuolas varían tanto en tamaño como en número (Ebner et al., 2005). Las vacuolas pequeñas es probable que desaparezcan, en cambio, cuanto más grande o más vacuolas hay es más probable que se fusionen o dividan durante la división celular (Mayer et al., 2018).

La categorización para las vacuolas de embriones tempranos (día 2 o 3 de desarrollo) según ASEBIR es la siguiente (Figura 2):

Figura 2

Categorización embrionaria en función de la presencia de vacuolas

A Ausencia de vacuolas	B ≤ 50% de blastómeros con vacuolas pequeñas (≤ 5 -14 μm)	C ≤ 50% de blastómeros con vacuolas grandes (> 14 μm)	D > 50% de blastómeros con vacuolas pequeñas (≤ 5 -14 μm) > 50% de blastómeros con vacuolas grandes (> 14μm)*	
				

Nota. (ASEBIR., 2015)

En cuanto a la incidencia general de la vacuolización, los datos publicados muestran que entre el 26,9% (Lee et al., 2023) y 28,2% (Zhang et al., 2018) de los blastocistos presentan vacuolas, o han mostrado alguna a lo largo del desarrollo embrionario. La vacuolización varía en función del día de desarrollo embrionario. La prevalencia de la vacuolización en

la etapa de cigoto se encuentra entre el 5% (Mayer et al., 2018) y el 10% (Ebner et al., 2005). En la etapa de 2 a 8 células (día 2 y 3) la probabilidad es del 2% (Ebner et al., 2005; Lee et al., 2023; Mayer et al., 2018). Sin embargo, la etapa de 8 células a mórula es la frecuente y más probable para la vacuolización (Zhang et al., 2019). La probabilidad de formación de vacuolas alcanzó su punto máximo el día 4, siendo entre un 11% (Lee et al., 2023) y un 14% (Chen et al., 2022). La tasa de vacuolización espontánea en el estadio de blastocisto (sin vacuolas el día 4) es del 6,5 % (Mayer et al., 2018).

Las causas de la vacuolización son controvertidas (Lee et al., 2023). Se cree que pueden surgir espontáneamente, por fusión de vesículas más pequeñas procedentes del aparato de Golgi o del retículo endoplasmático liso, que anteriormente no eran visibles, o generarse artificialmente en el ICSI (Mayer et al., 2018), debido a la encapsulación de polivinilpirrolidona o medio que podría haber penetrado a la célula durante la inyección (Ebner et al., 2005).

Esto explicaría el hecho de obtener significativamente más vacuolas en ciclos ICSI (40%) en comparación con los ciclos FIV (24%) (Ebner et al., 2005). Además, el grupo de Ebner observaron cómo ninguna vacuola de los cigotos que provenían de ciclos FIV convencionales desapareció, pero el 28,6% de las vacuolas de ciclos ICSI no se detectaron en día 2 (Ebner et al., 2005). Lo que sugiere que igual las de FIV ya las presentaba el ovocito en origen, y no que forman espontáneamente por actividad citoplasmática, o por la técnica de inseminación utilizada.

8.3.1. Tasas de laboratorio FIV

La vacuolización espontánea en el día 4 está estrechamente relacionado con la detención del desarrollo, ya que se asocia con una tasa de blastulación reducida y, además, con una peor calidad de blastocisto (Ebner et al., 2005). La **tasa de formación de blastocistos** en embriones vacuolados es significativamente menor (50,6% vs 54,8%, $p= 0.027$) y también la tasa de formación de blastocistos de buena calidad (46,7% vs 53,4%, $p= 0.018$) (Chen et al., 2022). Estudios más recientes corroboran los resultados del estudio de Ebner (Mayer et al., 2018; Yu et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Como podemos observar en la tabla 5, el grupo de blastocistos vacuolados posee menos blastocistos de calidad óptima y más blastocistos de calidad subóptima en comparación con el grupo de blastocistos sin vacuolas.

Tabla 5

El impacto de las vacuolas en la calidad de los blastocistos

Table 3 The impact of vacuoles on blastocyst quality

	Vacuole positive embryos (<i>n</i> = 287)	Vacuole negative embryos (<i>n</i> = 386)	<i>p</i> value
Best (%)	7.7 (22/287)	19.9 (77/386)	0.000 ^a
Good (%)	27.9 (80/287)	39.1 (151/386)	0.002 ^a
Fair (%)	23.7 (68/287)	11.9 (46/386)	0.000 ^a
Discarded (%)	40.8 (117/287)	29.0 (112/386)	0.001 ^a

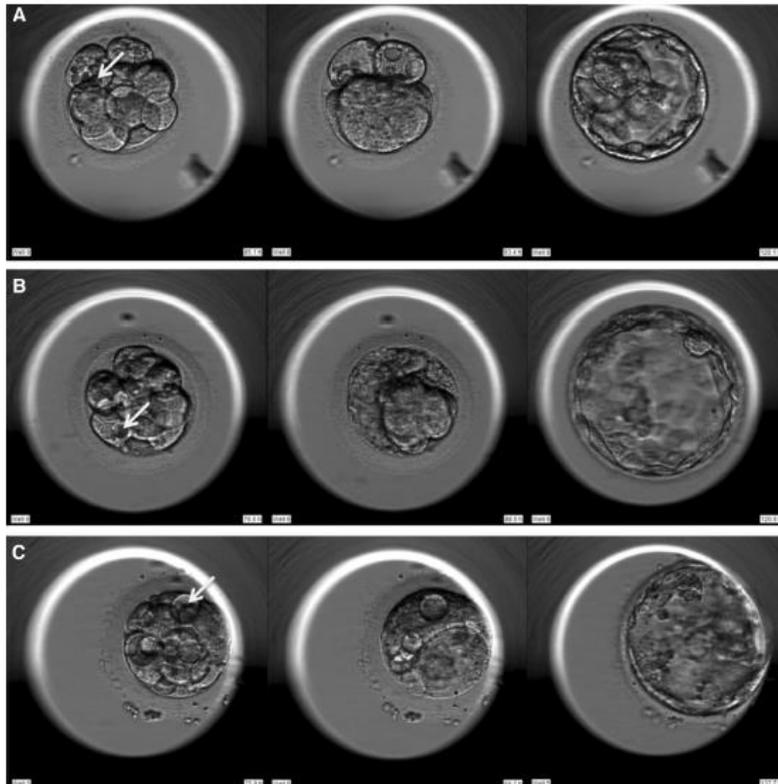
^a χ^2 test

Nota. (Zhang et al, 2018)

Cuanto más blastómeros estén afectados por las vacuolas, peor es el desarrollo del embrión como se demuestra en la figura 3 y en la tabla 6 (Zhang et al, 2018). Estos datos también son demostrados por Chen (Chen et al., 2022). Además, también concluyó que, con el aumento del tamaño de las vacuolas, la tasa de embriones de calidad óptima disminuía.

Figura 3

El desarrollo embrionario afectados por las vacuolas



Nota. De izquierda a derecha: estadio de escisión, mórula y blastocistos. A) La proporción de blastómeros afectados es baja, B) la proporción de blastómeros afectados fue mayor y C) la proporción fue alta. (Zhang et al., 2019)

Tabla 6

La asociación entre la calidad embrionaria y la proporción de blastómeros vacuolados

Table 4 The association between vacuolization and embryo quality

	Best (n=22)	Good (n=80)	Fair (n=68)	Discarded (n=117)
Starting time of vacuolization (h) ^a	73.4±8.0	73.0±8.9	73.9±8.3	74.1±10.2
Proportion of blastomeres with vacuoles (%) ^b	13.3 (44/330)	20.8(239/1148)	26.7 (227/850)	34.0 (454/1336)

^at test Differences in the starting time of vacuolization among the four groups were not significant (p>0.05)

^bχ² test Differences in the proportion of blastomeres with vacuoles among the four groups were all significant (p<0.05)

Nota. (Zhang et al., 2019)

Otro aspecto importante es la localización de las vacuolas en el blastocisto. En más de la mitad de los blastocistos las vacuolas se detectan exclusivamente en el trofotodermo (Ebner et al, 2005). En la masa celular interna (ICM) se encuentran con menos frecuencia que el trofotodermo y también hay una proporción de células vacuoladas que son excluidas del blastómero (Tabla 7).

Tabla 7

La localización de las células vacuoladas en el blastocisto

Occurrence and further fate of vacuoles spontaneously arising on day 4 of preimplantation development, n (%).			
Parameter	Group 1 (All vacuoles)	Group 2 (No vacuoles)	Group 3 (Mixed)
Spontaneous vacuoles (day 4)	62/62 (100)	0/499 (0)	153/481 (31.8)
Embryos affected (day 4)	102	0	153
Vacuole-free blastocysts	9/50 (18.0) ^{a,b}	477/510 (93.5) ^{a,c}	302/476 (63.5) ^{b,c}
No. of vacuoles (day 5)	41	33	174
In TE	28 (68.3)	25 (75.8)	123 (70.7)
In ICM	5 (12.2)	2 (6.0)	18 (10.4)
In EB	8 (19.5)	6 (18.2)	33 (19.0)

Note: EB = excluded blastomere; ICM = inner cell mass; TE = trophoctoderm. Spontaneous vacuolization is calculated per formed morula on day 4.
^ab,c p<.001.
Mayer. Blastocysts derived from vacuolized morulas. *Fertil Steril* 2018.

Nota. (Mayer et al., 2018)

Los pacientes con embriones vacuolados y no vacuolados no presentan diferencias en cuanto a edad, nivel basal de FSH, número de ovocitos recuperados y concentración

seminal (Chen et al., 2022; Ebner et al., 2005; Zhang et al., 2018), tal y como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8

Comparación de las variables parentales en los ciclos vacuola positivos y vacuola negativos

Table 1 Comparison of parental variables in vacuole positive cycles and vacuole negative cycles

	Vacuole positive cycles (n= 119)	Vacuole negative cycles (n= 303)	p value
Female age (years)	31.7 ± 4.5	31.0 ± 4.8	0.213 ^a
Basal FSH (IU/L)	6.9 ± 4.9	7.2 ± 6.6	0.661 ^a
No. of oocytes retrieved	12.4 ± 2.9	12.4 ± 3.9	0.946 ^a
Sperm concentration of IVF (× 10 ⁶ /mL)	54.4 ± 26.6	55.4 ± 32.6	0.826 ^a
Sperm concentration of ICSI (× 10 ⁶ /mL)	19.8 ± 23.5	24.4 ± 27.0	0.374 ^a
Fertilization rate (%)	86.1 (1150/1335)	84.9 (2866/3377)	0.267 ^b
Normal fertilization rate (%)	73.6 (982/1335)	72.8 (2457/3377)	0.577 ^b

^at test

^bχ² test

Nota. (Zhang et al., 2018)

8.3.2. Tasas clínicas

En cuanto a los **resultados clínicos**, los estudios realizados muestran resultados controvertidos. Por un lado, tal y como se indica en la tabla 9, no se encuentran diferencias significativas en cuanto a la tasa de implantación cuando se comparan blastocistos vacuolados frente a no vacuolados. Pese a que la tasa aborto espontáneo parece aumentar, la diferencia tampoco es significativa. Chen tampoco encuentra diferencias estadísticamente significativas respecto a la tasa de implantación, embarazo y recién nacido vivo (tabla 10) (Chen et al., 2022).

Tabla 9

Tasas de implantación y de aborto espontáneo en blastocistos vacuolados y vacuola negativos

Table 2 The development outcomes of embryos with or without vacuoles

	Vacuole positive embryos (n = 287)	Vacuole negative embryos (n = 386)	p value
Blastulation rate (%)	78.7 (226/287)	88.3 (341/386)	0.001 ^a
Good quality blastulation rate (%)	59.2 (170/287)	71.0 (274/386)	0.001 ^a
Implantation rate (%)	55.6 (25/45)	53.3 (40/75)	0.813 ^a
Miscarriage rate (%)	16.0 (4/25)	7.5 (3/40)	0.507 ^a

^a χ^2 test

Nota. (Zhang et al, 2018)

Sin embargo, otros grupos sí encuentran diferencias estadísticas en cuanto a tasas de implantación entre embriones no vacuolados y vacuolados (56,6% vs 35.5%, $p < 0.05$) (Lee et al., 2023). Los mismos autores también reportan una tasa de recién nacido vivo mayor para blastocistos no vacuolados (52,2% frente a 29% de blastocistos vacuolados) ($p < 0.05$). Aun así, respecto a la tasa de aborto espontáneo no difiere de Zhang dado que no encuentran diferencia significativa entre los dos grupos (Zhang et al., 2018).

Con respecto a las tasas de **euploidía y mosaicismo**, los resultados también son contradictorios. Hay artículos que no encuentran diferencias significativas entre ambos grupos (Chen et al, 2022), como se muestra en la tabla 10. La tasa de euploidía para embriones vacuolados y para embriones no vacuolados es de 53% y 52,7% respectivamente ($p = 0.927$) y la tasa de mosaicismo es de 5,3% y 4,2% respectivamente ($p = 0.413$).

Tabla 10

Tasas clínicas de blastocistos vacuolados y no vacuolados

TABLE 2 Embryological, clinical, and neonatal outcomes for vacuole-positive and vacuole-negative embryos.

	Vacuole-positive embryos	Vacuole-negative embryos	P
Blastocyst formation (%)	403/796 (50.6)	2691/4907 (54.8)	0.027
High-quality embryo rate (%)	168/360 (46.7)	1438/2691 (53.4)	0.018
Mosaicism (%)	13/245 (5.3)	71/1703 (4.2)	0.413
Euploidy (%)	123/232 (53)	860/1632 (52.7)	0.927
Implantation rate (%)	35/63 (55.6)	311/472 (65.9)	0.107
Ongoing pregnancy rate (%)	27/63 (42.9)	251/472 (53.2)	0.124
Live-birth rate (%)			
total	26/63 (41.3)	217/472 (46)	0.481
Monozygotic twins	2	5	/
Mode of delivery			0.422 ^a
natural delivery (%)	7/63 (28)	46/472 (21)	
cesarean (%)	18/63 (72)	173/472 (79)	
Birth weight			
singleton	3254.35 ± 368.01	3338.52 ± 566.15	0.168
Monozygotic twins	1775 ± 694.62	2525 ± 599.79	0.076
Low birth weight			
singleton (%)	1/25 (4.0)	12/230 (5.2)	0.793
Monozygotic twins	1	1	/
Birth length (cm)			
singleton	50.19 ± 1.33	50.02 ± 1.33	0.81
Monozygotic twins	/	/	/
Preterm birth			
singleton (%)	2/26 (7.7)	24/217 (11.1)	0.6
Monozygotic twins	0	1	/
Birth defect			
singleton (%)	2/34 (5.9)	14/222 (6.3)	0.527
Monozygotic twins	0	0	/

^aP values for testing overall differences between the groups.

Nota. (Chen et al, 2022)

Sin embargo, otros autores sí encuentran diferencias significativas en cuanto a la tasa de euploidía/aneuploidía cuando comparan blastocistos vacuolados con los que no lo están (tabla 11). El grupo de Lee señalan una tasa de euploidía del 28,8% para embriones vacuolados y de 35,5% para embriones no vacuolados (p<0.001) (Lee et al., 2023).

Tabla 11

Comparación de las tasas genéticas en grupos de blastocistos vacuolados y no vacuolados

Characteristic	Total	Vacuole-positive	Vacuole-negative
Blastocyst (n)	3351	903	2448
Age (y) (mean ± SD)	35.4 ± 4.2	35.7 ± 4.1	35.3 ± 4.2
Results of PGT-A			
Euploidy (%)	33.7 (1130/3351)	28.8 (260/903)*	35.5 (870/2448)*
Aneuploidy (%)	66.3 (2221/3351)	71.2 (643/903)*	64.5 (1578/2448)*
Blastocyst morphology [†]			
Excellent (%)	4.5 (148/3351)	2.8 (25/903)*	5.0 (123/2448)*
Good (%)	74.0 (2481/3351)	66.7 (602/903)*	76.8 (1879/2448)*
Poor (%)	21.5 (722/3351)	30.6 (276/903)*	18.2 (446/2448)*

Note: Data are reported as mean ± SD, or % (n) as appropriate. PGT-A = preimplantation genetic testing for aneuploidy, SD = standard deviation.
* P<.001 determined by the chi-square test.
[†] Embryo morphology grades were defined as follows: excellent-quality blastocysts with inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) of AA; good-quality blastocysts with ICM and TE grade of AB, BA, and BB; and poor-quality blastocysts with ICM and TE grade of BC.
Lee. Vacuoles aid euploid embryo selection. *Fertil Steril* 2023.

Nota. (Lee et al., 2023)

En cuanto a la **localización de las vacuolas en el blastocisto** y su relación con las tasas clínicas, el grupo de Chen mostraron las tasas clínicas diferenciando en tres grupos: blastocistos no vacuolados (NC), blastocistos en los que las células vacuoladas participaron en la compactación (VAC+C) y blastocistos en los que las células vacuoladas no formaron parte de la compactación (VAC-C). Como se muestra en la tabla 12, las tasas del grupo VAC-C no difirieron en cuanto a las del grupo NC. Sin embargo, las tasas de implantación, embarazo en curso y RNV del grupo VAC+C fueron significativamente más bajas que las del grupo NC. El grupo VAC+C mostró una tasa de mosaicismo significativamente mayor que los grupos VAC-C y NC (Chen et al., 2022).

Tabla 12

Tasas clínicas en blastocistos VAC-C, VAC+C y NC

TABLE 4 Embryological and clinical outcomes in VAC+C, VAC-C, and NC groups.

	VAC-C=1	VAC+C =2	NC=0	<i>P</i> <i>1 vs. 2</i>	<i>P</i> <i>1 vs. 0</i>	<i>P</i> <i>2 vs. 0</i>
Blastocyst formation rate (%)	313/480 (65.2)	83/120 (69.2)	2440/2930 (83.3)	0.413	0.000	0.000
High-quality Blastocyst rate (%)	130/249 (52.2)	38/88 (43.2)	1306/2440 (53.5)	0.145	0.739	0.056
Mosaicism (%)	7/187 (3.7)	6/55 (10.9)	61/2292 (2.7)	0.038	0.351	0.004
Euploidy (%)	94/180 (52.2)	27/49 (55.1)	773/1478 (52.3)	0.72	1.0	0.772
Implantation rate (%)	29/48 (60.4)	6/15 (40.0)	282/412 (68.4)	0.165	0.259	0.027
Ongoing pregnancy rate (%)	23/48 (47.9)	4/15 (26.7)	228/412 (55.3)	0.147	0.360	0.035
Live-birth rate (%)	23/48 (47.9)	3/15 (20)	198/412 (48.1)	0.055	1.0	0.037
Mode of delivery				0.250 ^a	0.283 ^a	0.363 ^a
natural delivery (%)	7/23 (30.43)	0/3 (0)	43/198 (21.71)			
cesarean (%)	15/23 (65.22)	3/3 (100)	155/198 (78.28)			
Birth weight	3058.33 ± 713.94	2850 ± 150	3330.32 ± 549.96	0.287	0.784	0.987
Low birth weight (%)	3/23 (13.04)	0/3 (0)	11/198 (5.6)	0.506	0.167	0.675
Birth length (cm)	50.46 ± 1.27	49 ± 1	50.04 ± 1.32	0.235	0.967	0.586
Preterm birth (%)	2/23 (8.70)	0/3 (0)	21/198 (10.61)	0.595	0.776	0.551
Birth defect (%)	1/23 (4.35)	0/3 (0)	7/198 (3.53)	0.713	0.804	0.741

^aP values for testing overall differences between the groups.

Nota. Tasas clínicas en los 3 grupos: blastocistos no vacuolados (NC), blastocistos en los que las células vacuoladas participaron en la compactación (VAC+C) y blastocistos en los que las células vacuoladas no formaron parte de la compactación (VAC-C). (Chen et al, 2022)

9. Discusión

9.1. Vacuolas en espermatozoides

Gracias a la llegada del MSOME se han podido estudiar muchas de las anomalías morfológicas que puede presentar un espermatozoide y cómo estas influyen en las tasas clínicas. Pocos años después de la observación de espermatozoides a grandes aumentos, se introdujo un nuevo sistema (IMSI) en los laboratorios de FIV; es un procedimiento de ICSI modificado que selecciona los espermatozoides a 6000 aumentos. La IMSI ha permitido clasificar los espermatozoides en cuatro grupos, atendiendo al número y tamaño de vacuolas. Los grupos I y II presentan pocas vacuolas y pequeñas, y los grupos III y IV mayor número de vacuolas y de mayor tamaño.

Parece ser que hay una correlación directa entre los parámetros tradicionales del seminograma y la graduación de vacuolas según MSOME: a peor calidad espermática, mayor número de vacuolas tipo IV.

Los estudios que utilizan MSOME para estudiar las vacuolas en espermatozoides muestran que el número de espermatozoides sin vacuolas en humanos es extremadamente pequeño: la incidencia de espermatozoides vacuolados es mayor al 90% (Tanaka et al., 2012), siendo el porcentaje de vacuolas pequeñas entre el 27,3% y el 49,3% y el de vacuolas grandes entre el 24-25%. A pesar de la búsqueda extensa con IMSI, no siempre es posible incluso con esta técnica encontrar y seleccionar espermatozoides para la fecundación sin vacuolas o al menos con un máximo de dos pequeñas vacuolas (Vanderzwalmen et al., 2008).

El origen de estas vacuolas, aunque desconocido, se cree que se deben a una defectuosa condensación del ADN durante la espermiogénesis (Fortunato et al., 2016). La presencia de un elevado porcentaje de vacuolas en una muestra seminal, por tanto, podría significar mayores tasas de fragmentación, y por tanto a un peor pronóstico en los ciclos de FIV. Sin embargo, en este trabajo no se han encontrado artículos publicados al respecto que sustenten esta hipótesis, debido probablemente a que la técnica de IMSI es muy cara, y pocos laboratorios la tienen incluida en sus rutinas de trabajo. Se podría plantear un estudio indirecto realizando morfología mediante tinción a muestras fragmentadas frente a un grupo control de fragmentación negativa, y ver si realmente hay una correlación entre ambos factores. Obviamente el tamaño de las vacuolas observadas sería de los grupos III

y IV, al no disponer de la posibilidad de aumento que presenta la técnica de IMSI.

En cuanto a los resultados de laboratorio, los artículos publicados muestran que no hay diferencia respecto a la tasa de fecundación dependiendo de los diferentes grados de calidad de los espermatozoides.

Atendiendo a la bibliografía consultada, la mayoría de los estudios no muestran un desarrollo embrionario hasta D3 comprometido; sin embargo, se han encontrado menores tasas de formación de blastocisto, y los que llegan son de peor calidad cuando las vacuolas en espermatozoides son múltiples o de gran tamaño.

Hay estudios que muestran que el uso de la IMSI no mejora significativamente los resultados clínicos de ICSI (Tanaka et al., 2012). Sin embargo, hay otros que argumentan a favor del IMSI (Boitrelle et al., 2013). La selección de los pacientes a los que se aplica IMSI, sus regímenes de estimulación y las características seminales de los hombres contribuyen a la heterogeneidad de los resultados.

Según las publicaciones incluidas en este trabajo, los resultados clínicos presentan unas tasas disminuidas de implantación, embarazo y recién nacido vivo de los espermatozoides tipo III y IV con respecto a los espermatozoides tipo I y II (Greco et al., 2013). Sin embargo, se necesitan más estudios sobre los efectos en las tasas clínicas de transferencia de blastocistos que provienen de los diferentes subgrupos de espermatozoides vacuolados.

Las limitaciones generales que se han encontrado en la búsqueda bibliográfica realizada son dos: por un lado, el escaso tamaño muestral de los espermatozoides microinyectados con IMSI; y por otro, la falta de consenso en cuanto a la definición de los tamaños a partir de los cuales una vacuola es considerada pequeña o grande.

9.2. Vacuolas en ovocitos

Los dismorfismos ovocitarios son relativamente frecuentes en los ciclos de FIV, pues afectan al 60-70% de los ovocitos obtenidos. La tasa de incidencia de ovocitos vacuolados se encuentra entre el 3-12% y su tasa de fecundación es menor que la de ovocitos no vacuolados. Se ha reportado que a partir de vacuolas mayores de 14 μm el riesgo de fallo de fecundación aumenta (Ebner et al., 2005). La última edición de los cuadernos de

Embriología Clínica de ASEBIR contempla este aspecto en su clasificación morfológica.

La relación entre el tamaño de las vacuolas y los resultados de la fecundación se puede explicar mediante dos hipótesis. La primera se debe a que es muy probable que una vacuola grande o varias vacuolas pequeñas causen un efecto más perjudicial porque una mayor parte del citoesqueleto puede que no esté funcionando como debería. La segunda se debe a que vacuolas grandes pueden desplazar el huso meiótico de su posición polar, lo que puede resultar en un fallo de fecundación, no iniciar la primera escisión o mostrar un patrón de citocinesis anormal (Ebner et al, 2005).

Además de una menor tasa de embriones de buena calidad a partir de D3, las tasas de éxito para los resultados de las técnicas de reproducción asistida también se ven afectadas. Los ovocitos vacuolados disminuyen las tasas de implantación y embarazo y aumentan la tasa de aborto espontáneo (Braga et al., 2023).

Las principales limitaciones encontradas en los estudios de ovocitos vacuolados se deben a que no hay una distinción entre los tamaños de las vacuolas que se microinyectan ni tampoco evalúan la presencia de varias vacuolas. Asimismo, en numerosos artículos las anomalías morfológicas en los ovocitos se agrupan sin tener claro el impacto de cada una por separado.

9.3. Vacuolas en desarrollo embrionario

La aparición espontánea de vacuolas a lo largo del desarrollo embrionario es relativamente frecuente (26-28%). La incidencia de vacuolización en función del estadio embrionario es significativamente mayor en D4 de desarrollo, debido probablemente a una mayor actividad citoplasmática provocada por la transición del estadio en células a la compactación en mórula.

La vacuolización espontánea en embriones perjudica la capacidad de formación de blastocistos y la calidad de estos. Además, cuanto mayor es el número de blastómeros que poseen vacuolas y cuanto más grandes sean dichas vacuolas, peores son los resultados de desarrollo embrionario (Chen et al., 2022). En concreto, se ha observado que la vacuolización en la etapa de compactación (D4) afecta negativamente tanto a la formación del blastocisto como a la calidad del mismo.

Respecto a las tasas clínicas, los resultados no son concluyentes. Parece ser que la tasa de aborto no aumenta por la presencia de vacuolas en los blastocistos, pero en cuanto a la tasa de implantación, unos autores encuentran significancia estadística y otros no. Además de la variabilidad en los grupos de estudio, puede que las diferencias se deban, en parte, al hecho de no distinguir entre los embriones que utilizan en la compactación las células vacuoladas de los embriones que no las acoplan. Gracias al estudio de Chen, se puede concluir que dichas tasas tienen peores pronósticos cuando las células vacuoladas participan en la compactación (Chen et al., 2022). Se especula que los embriones excluyen a las células anormales durante la compactación como mecanismos de autocorrección del embrión. Esta hipótesis se respalda con las menores tasas de mosaicismo en embriones en los que las células vacuoladas no forman parte de la compactación en comparación con los que si forman parte (Chen et al., 2022).

Por otro lado, los resultados de screening genético cuando se biopsian blastocistos vacuolados frente a no vacuolados también muestran resultados contradictorios: por un lado, parece que hay una asociación entre menor tasa de euploidía y vacuolas, pero otros autores no han encontrado diferencias significativas.

Esta ambigüedad en los resultados clínicos y de screening genético pueden deberse al reducido número muestral de embriones vacuolados, la principal limitación encontrada en la gran mayoría de los artículos revisados. Este inconveniente se suele ver agrandado por el escaso número de embriones vacuolados transferidos. Esto puede explicar los resultados no concluyentes encontrados.

Otro resultado interesante es la tendencia de la eliminación de vacuolas de la masa celular interna porque la gran mayoría de las vacuolas se ubican exclusivamente en el trofotodermo. Este hecho puede ser una estrategia del embrión para reducir el impacto negativo de la vacuolización en la implantación (Ebner et al., 2005).

En base a todo lo expuesto en este trabajo podemos decir que, actualmente, la clasificación ASEBIR se queda un poco corta en cuanto a la clasificación de vacuolas en embriones, ya que con los sistemas time-lapse se ha demostrado que es un evento dinámico, difícilmente evaluable mediante criterios de morfología clásica. De hecho, la clasificación que propone es hasta D3 de desarrollo, pero no dice nada del estadio de blastocisto. Una propuesta de mejora sería añadir a los criterios ASEBIR una clasificación

respecto a las vacuolas en las que se diferencien aquellos embriones que compactan sus células vacuoladas y aquellos embriones en los que las excluyan del proceso, debido a que podrían tener un impacto diferente en las tasas clínicas.

10. Conclusiones

- 1- El origen de vacuolas en espermatozoides se puede deber a un defecto en el empaquetamiento de la cromatina. Más del 90% de espermatozoides presenta este dismorfismo. Sería interesante plantear una línea de investigación que relacionase estos dos aspectos con los tratamientos de FIV.
- 2- La aparición del MSOME/IMSI como nuevo sistema de microinyección ovocitaria ha introducido un nuevo criterio de clasificación de los espermatozoides en función del número y tamaño de vacuolas.
- 3- La microinyección de espermatozoides tipo I y II presenta mejor pronóstico en cuanto a tasas de desarrollo a blastocisto, tasa de gestación clínica, implantación y Recién Nacido Vivo.
- 4- Las vacuolas en ovocitos pueden surgir de manera espontánea o por la fusión de vesículas preexistentes de retículo endoplasmático liso o del aparato de Golgi. Su presencia oscila entre el 3-12%.
- 5- Ovocitos con vacuolas mayores de 14 μm presentan un riesgo mayor de fallo de fecundación.
- 6- Parece ser que la presencia de vacuolas en los ovocitos tiene como consecuencia una peor calidad embrionaria en estadios tempranos de desarrollo, que repercute a su vez negativamente en las tasas de gestación, implantación y aborto.
- 7- La aparición espontánea de vacuolas en embriones varía en función del estadio, pero parece ser que entre D3 y D4 es cuando más probabilidad hay de que este dismorfismo aparezca.
- 8- Parece ser que la tasa de blastocisto y de blastocisto de buena calidad es menor en embriones vacuolados. Sin embargo, tanto la tasa de embriones euploides como los resultados clínicos son controvertidos, por lo que se necesitan más estudios que corroboren los resultados publicados.
- 9- La localización de las vacuolas en la formación del blastocisto parece ser un factor pronóstico importante de éxito de los tratamientos de FIV.
- 10- Los sistemas de clasificación morfológica clásica penalizan la presencia de vacuolas en general. Sin embargo, gracias al sistema time-lapse, se pueden hacer subclasificaciones en función del tiempo de aparición, si las células que las presentan están involucradas o no en la formación de la mórula y el blastocisto, etc. De este

modo se podría obtener una mejor caracterización de cómo afectan las vacuolas al desarrollo embrionario y a la capacidad de dar lugar a un recién nacido vivo sano.

11. Bibliografía

- Asociación para el estudio de la biología de la reproducción [ASEBIR]. (2015). *Criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos 3ª Edición* . www.gobalo.es
- Bartolacci, A., Intra, G., Coticchio, G., dell'Aquila, M., Patria, G., & Borini, A. (2022). Does morphological assessment predict oocyte developmental competence? A systematic review and proposed score. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02370-3>
- Bendayan, M., Caceres, L., Saïs, E., Swierkowski-Blanchard, N., Alter, L., Bonnet-Garnier, A., & Boitrelle, F. (2022). Human Sperm Morphology as a Marker of Its Nuclear Quality and Epigenetic Pattern. *Cells*, 11(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/cells11111788>
- Boitrelle, F., Albert, M., Petit, J. M., Ferfour, F., Wainer, R., Bergere, M., Bailly, M., Vialard, F., & Selva, J. (2013). Small human sperm vacuoles observed under high magnification are pocket-like nuclear concavities linked to chromatin condensation failure. *Reproductive BioMedicine Online*, 27(2), 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.05.004>
- Braga, D. P. A. F., Setti, A., Morishima, C., Provenza, R. R., Iaconelli, A., & Borges, E. (2023). The effect of sperm DNA fragmentation on ICSI outcomes depending on oocyte quality. *Andrology*, March, 1–12. <https://doi.org/10.1111/andr.13435>
- Chen, L., Zhang, S., Gu, Y., Peng, Y., Huang, Z., Gong, F., & Lin, G. (2022). Vacuolization in embryos on days 3 and 4 of in vitro development: Association with stimulation protocols, embryo development, chromosomal status, pregnancy and neonatal outcomes. *Frontiers in Endocrinology*, 13(October), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.985741>
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Shebl, O., Jesacher, K., & Tews, G. (2005). Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertility and Sterility*, 83(6), 1635–1640. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.02.009>

- Fortunato, A., Boni, R., Leo, R., Nacchia, G., Liguori, F., Casale, S., Bonassisa, P., & Tosti, E. (2016). Vacuoles in sperm head are not associated with head morphology, DNA damage and reproductive success. *Reproductive BioMedicine Online*, *32*(2), 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.10.009>
- Greco, E., Scarselli, F., Fabozzi, G., Colasante, A., Zavaglia, D., Alviggi, E., Litwicka, K., Varricchio, M. T., Minasi, M. G., & Tesarik, J. (2013). Sperm vacuoles negatively affect outcomes in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection in terms of pregnancy, implantation, and live-birth rates. *Fertility and Sterility*, *100*(2), 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.04.033>
- Lee, Y. J., Lin, Y. P., Cheng, E. H., Chen, C. H., Huang, C. C., Lin, P. Y., Lee, T. H., & Lee, M. S. (2023). The presence of vacuoles in blastocysts is negatively associated with euploidy and live birth rates. *Fertility and Sterility*, *5*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.04.023>
- Mayer, R. B., Shebl, O., Oppelt, P., Reiter, E., Altmann, R., Enengl, S., Allerstorfer, C., & Ebner, T. (2018). Good-quality blastocysts derived from vacuolized morulas show reduced viability. *Fertility and Sterility*, *109*(6), 1025–1029. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.02.131>
- Rienzi, L., Ubaldi, F. M., Iacobelli, M., Minasi, M. G., Romano, S., Ferrero, S., Sapienza, F., Baroni, E., Litwicka, K., & Greco, E. (2008). Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertility and Sterility*, *90*(5), 1692–1700. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.024>
- Setti, A. S., Braga, D. P. de A. F., Vingris, L., Serzedello, T., Figueira, R. de C. S., Iaconelli, A., & Borges, E. (2014). Sperm morphological abnormalities visualised at high magnification predict embryonic development, from fertilisation to the blastocyst stage, in couples undergoing ICSI. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *31*(11), 1533–1539. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0326-9>
- Setti, A. S., De Almeida Ferreira Braga, D. P., Vingris, L., De Cassia Savio Figueira, R., Iaconelli, A., & Borges, E. (2013). The prevalence of sperm with large nuclear vacuoles is a prognostic tool in the prediction of ICSI success. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *31*(3), 307–312. <https://doi.org/10.1007/s10815-013->

- Tanaka, A., Nagayoshi, M., Tanaka, I., & Kusunoki, H. (2012). Human sperm head vacuoles are physiological structures formed during the sperm development and maturation process. *Fertility and Sterility*, *98*(2), 315–320.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.034>
- Ten, J., Mendiola, J., Vioque, J., de Juan, J., & Bernabeu, R. (2007). Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reproductive BioMedicine Online*, *14*(1), 40–48. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60762-6](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60762-6)
- Vanderzwalmen, P., Hiemer, A., Rubner, P., Bach, M., Neyer, A., Stecher, A., Uher, P., Zintz, M., Lejeune, B., Vanderzwalmen, S., Cassuto, G., & Zech, N. H. (2008). Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reproductive BioMedicine Online*, *17*(5), 617–627. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60308-2](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60308-2)
- Yu, C., Zhang, R., Li, J., & Zhou-Cun, A. (2018). A predictive model for high-quality blastocyst based on blastomere number, fragmentation, and symmetry. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *35*(5), 809–816.
<https://doi.org/10.1007/s10815-018-1132-6>
- Zanetti, B. F., Braga, D. P. A. F., Provenza, R. R., Figueira, R. C. S., Iaconelli, A., & Borges, E. (2018). Sperm morphological normality under high magnification is correlated to male infertility and predicts embryo development. *Andrology*, *6*(3), 420–427. <https://doi.org/10.1111/andr.12473>
- Zhang, J., Zhong, W., Liu, H., Zhao, H., Li, M., Ma, S., & Wu, K. (2019). Using time-lapse technology to explore vacuolization in embryos on Day 3 and Day 4. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *299*(3), 857–862.
<https://doi.org/10.1007/s00404-018-5008-x>