	INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA ICSI		Código	
			PS-DC-026	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 1 de 8

1. OBJETIVO

Inyección intracitoplasmática de un espermatozoide por óvulo.

2. ALCANCE

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este protocolo está orientado para el personal profesional del laboratorio de Embriología.

4. RESPONSABLE

- Embriólogo

5. REFERENCIAS

- IT Preparación de Medios y Reactivos
- POE Capacitación Seminal
- POE Punción Folicular

6. DEFINICIÓN

La inyección intracitoplasmática de un espermatozoide consiste en la inmovilización de un espermatozoide, luego, con un sistema de micromanipulación y bajo la observación de un microscopio de luz invertida es inyectado en el citoplasma de un óvulo previamente desnudado y orientado.

7. SIGLAS

ICSI – Inyección Intracitoplasmática de espermatozoide.


CCO – Complejo Cumulus Óvulo (Corona)

CP – Corpúsculo Polar

8. INDICACIONES CLÍNICAS

Las principales indicaciones de esta técnica es la esterilidad de causa masculina. Esta técnica ha mejorado notablemente el pronóstico reproductivo de hombres con oligozoospermia, Astenozoospermia, Teratozoospermia e incluso azoospermia. Se recurre a la utilización de esta técnica en casos de:

- Factor masculino grave.
- Muestras de semen valiosas (Biopsias testicular, aspirado de epidídimo).
- Alteraciones en la eyaculación (eyaculación retrograda).

	INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA ICSI		Código	
			PS-DC-026	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 2 de 8

- Semen valioso (pacientes con cáncer).
- Falla de fecundación por FIV.
- Menos de 6 óvulos por aspiración.
- Diagnostico pre-implantación.
- Utilización de óvulos después de desvitrificación.

9. TIPO DE MUESTRA

Óvulos obtenidos por punción folicular, decumulación del complejo cumulus y espermatozoides capacitados, procedentes de semen fresco, congelado, muestras testiculares o de epidídimo.

10. INFORMACIÓN GENERAL

10.1 Manipulación de la Muestra


- Confirmar e identificar los medios a utilizar en los tubos y placas pertinentes.
- Identificar la identidad de los pacientes en el formato "FIV/ICSI" con la información de las placas de mantenimiento de óvulos y ICSI.
- Los procedimientos efectuados como los indica este POE solo serán realizados después de ser leídos y firmados por los pacientes los consentimientos informados.
- Siempre que se realice manipulación de óvulos debe ser en superficies con temperaturas controladas (37°C).

11. MATERIAL NECESARIO

Material descartable	Equipos	Medios y reactivos
<ul style="list-style-type: none"> • Puntas de Pipetas 0.2 - 200µl • Puntas de Stripper 275, 175 o 135 µm • Placas de Petri 60mm • Placas de 4 pozos • Tubo Falcon 14ml • Microtubo 1.5ml • Pipeta Holding 30° • Pipeta ICSI 30° • Timer 	<ul style="list-style-type: none"> • Cámara de Flujo Laminar • Incubadora 37°C, 5% O₂ y 6.5% CO₂ • Incubadora 37°C y 6.5% CO₂ • Micropipeta 0,2-20 µl • Stripper metálica • Microscopio Óptico Invertido • Sistema de Micromanipulación • Estereomicroscopio • Lápiz de Punta de Diamante 	<ul style="list-style-type: none"> • Global Total for Fertilization • Lite Oil • Paraffin Oil • Hyase -10X • PVP • Pentoxifilina • Global Collect • Global Protein Supplement • Global Total

Tabla 1. Materiales necesarios para la realización de este procedimiento.

12. EQUIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

	INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA ICSI	Código	
		PS-DC-026	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1
			Página 3 de 8

- Tapabocas
- Gorro desechable
- Guantes de nitrilo estériles

13. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO

13.1. Día anterior


1. Preparación de los medios de capacitación seminal y manejo de estructuras durante y después de la aspiración folicular, estos están descritos en la TI "Preparación de Medios y Reactivos"; todo debe prepararse de acuerdo con la cantidad de óvulos esperados.
2. Preparar una caja de 4 pozos para la decumulación de los óvulos obtenidos de la aspiración, así como describe la TI "Preparación de Medios y Reactivos".
3. Preparar una placa de equilibrio de óvulos según la cantidad de estructuras que se piensen desvitrificar, si se necesitan óvulos desvitrificados.
4. Preparar una placa de cultivo con medio Total global por cada 5 óvulos previsto, así como describe la TI "Preparación de Medios y Reactivos".

13.2. Día de la ICSI

1. Preparar el semen de acuerdo con el POE "Capacitación Seminal".
2. Al final de la punción se debe confirmar la hora a la que se va a iniciar la decumulación de óvulos de la paciente (2 horas después de la punción).
3. Transcurridos 1 hora y 30 minutos de la obtención de los óvulos, se debe preparar la placa de 4 pozos de decumulación de la siguiente forma; 3 pozos de medio Global Collect suplementado al 10% con Global Protein Supplement por cada pozo de Hyase -10X preparada. (Para preparar la Hyase -10X ver IT "Preparación de Medios y Reactivos").
4. Si los óvulos con que se haría ICSI son desvitrificados, deben desvitrificarse como mínimo 2 horas antes de iniciar la ICSI, para que ellos tengan tiempo de recuperarse y poder evaluar supervivencia de los mismo antes de ser usados.
5. Antes de iniciar la ICSI se debe preparar la placa de acuerdo con el instructivo (ver IT "Preparación de Medios y Reactivos").

13.2.1. Decumulación de los Óvulos

6. Preparar la pipeta Stripper de 175 o 275 μ m, preparar la micropipeta 0,2-20 μ l, tener listo el timer o cronometro.

	INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA ICSI		Código PS-DC-026	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 4 de 8

7. Cuando se encuentre preparada la placa de decumulación y se estabilicen los medios dentro de la cabina durante 15 minutos, procedemos a sacar de la incubadora la placa de equilibrio de óvulos y seleccionar aquellos que se desnudarían.

8. Con la micropipeta aspirar los CCO de la placa y colocarlos en el primero pozo, el cual contiene la Hyase y a través de la repetida aspiración y liberación en el pozo, estos eliminarían mecánicamente la mayoría de las células de la granulosa (no deben estar en contacto con la enzima más de 30 segundos).

9. A continuación, culminado el tiempo, aspirar y pasar los óvulos al segundo pozo de la placa con la Stripper de 175 o 135 μm y el cual contiene medio Global Collect suplementado al 10% con Global Protein Supplement, posteriormente ir pasando los óvulos por los pozos restantes de la placa, aspirando y liberando repetidamente en cada uno, hasta quedarse sin la mayoría de las células de la corona.

10. Evaluar el estado de maduración nuclear con la ayuda del Microscopio Óptico Invertido.

11. Pasar los óvulos en metafase II, con la pipeta Stripper de 175 o 135 μm , para la placa de equilibrio y luego llevarlos a la incubadora nuevamente donde quedan en recuperación por 2 horas más hasta la realización de la ICSI.

13.2.2. Microinyección

12. Teniendo los óvulos y semen listos, preparar una placa de ICSI como se describe en la IT "Preparación de Medios y Reactivos, sin olvidar escribir el nombre de la paciente en la cubierta de la placa.


13. Dejar la placa ICSI en la platina caliente de la cabina de flujo laminar durante 15 minutos.

14. Tomar la muestra de espermatozoides capacitados con que se haría la ICSI y comprobar que todos los datos están correctos y esa la muestra que corresponde con el nombre de la paciente y procedimiento.

15. Colocar aproximadamente 1 μm (dependiendo de la concentración) de la muestra de semen capacitada en la primera gota de PVP de la placa de ICSI.

16. Preparar el sistema de Micromanipulación de la siguiente manera:

- Compruebe que la placa térmica, los oculares y los objetivos del microscopio invertido están limpios y que el sistema de microinyección no tiene nudos o suciedad interna en las mangueras (lo que provoca retraso y descontrol en la transmisión de la presión).
- Ajustar los joysticks manuales a la posición central que se tenga marcada.

	INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA ICSI		Código PS-DC-026	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 5 de 8

- Antes de colocar las pipetas de ICSI y Holding en la lanceta, verificar que no tenga restos de pipetas anteriores en su interior y luego si, introducirlas cuidadosamente las hasta la mitad de estas; tener mucho cuidado, ya que en las lancetas no encontraras resistencia.
- Enroscar la cabeza de la lanceta y liberar presión pinchando el botón central de joysticks.
- Colocar el Microinyector con la pipeta Holding en el sistema de Micromanipulación situado a la izquierda del microscopio invertido.
- Colocar el Microinyector que soporta la pipeta de Microinyección a la derecha; Colocar ambas pipetas frente una de la otra, de forma que queden perfectamente horizontales y en el centro del campo visual del microscopio.
- Con el objetivo de menor amplitud, las puntas de las pipetas se deben ir bajando progresivamente, de modo que queden alineadas en el mismo plano, y luego, se debe ir cambiando progresivamente a los demás objetivos hasta llegar al de 40X. (Verificar que con este objetivo tenemos la máxima libertad de movimientos en las cuatro direcciones de espacio).

17. Transferir los óvulos a la placa de ICSI, distribuyéndolos por las 6 gotas de medio Global Collect suplementado al 10% con Global Protein Supplement.

18. Ya en el microscopio invertido, enfocar el borde de la gota de lavado con medio PVP sin esperma. Descender y enfocar la pipeta de inyección permitiendo que, por capilaridad, entre medio en el interior de la pipeta y así se cree un soporte, aspirar medio y sacarlos en repetidas ocasiones.

19. Después de purgar y estabilizar las pipetas, ir a la gota de medio PVP con los espermatozoides y enfocar el borde de la gota, elegir, siempre que sea posible, un espermatozoide con buena morfología y movilidad.


20. Localizado el espermatozoide, colocar la punta de la pipeta sobre el tercio proximal del flagelo del espermatozoide y, con un movimiento perpendicular al espermatozoide, alcanzar el flagelo hasta que este quede angulado.

21. Aspirar el espermatozoide por la cola y elevar con el joystick manual la micropipeta de inyectar e ir hasta la primera gota que contiene el óvulo.

22. Después de enfocar el óvulo, descender la pipeta holding y la de inyección hasta que se encuentren en el mismo plano.

23. Con la ayuda de la pipeta de inyección, girar el óvulo hasta que el cuerpo polar (CP) se torne visibles.

24. Aspirar con la pipeta holding de forma que el óvulo esté inmovilizado con el CP en las posiciones de las 12 o 6 horas. Este paso es importante pues la posición del CP indica la posible posición de la placa meiótica.

	INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA ICSI		Código	
			PS-DC-026	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 6 de 8

25. Llevar el espermatozoide hasta la punta de la pipeta.

26. Con la pipeta de inyección presione suavemente y gradualmente sobre la zona pelúcida, manteniendo siempre en la punta el espermatozoide.

27. Una vez traspasada la zona pelúcida, continuar presionando la membrana del óvulo procurando que se forme un cono alrededor de la pipeta, moviendo ligeramente hacia arriba y hacia abajo.

28. Introduzca la pipeta de inyección muy lentamente dentro del óvulo, intentando que se rompa sin aspirar. Si esto no ocurre, proceder a la ruptura del óvulo a través de la aspiración u otro procedimiento, como el *stirring*. Ver tabla de referencias en el ítem siguiente para la clasificación del tipo de ruptura.

29. Después de romper la membrana del citoplasma, aspirar un poco de ooplasma para certificarse que la membrana se rompió y está en contacto con el espermatozoide.

30. Introduzca suavemente el espermatozoide, evitando introducir medio PVP en el interior del óvulo

31. Anotar todos los datos referentes a posición donde el espermatozoide fue depositado, la posición del CP (en posición de 12 en punto y dividiendo el óvulo en 6 cuadrantes), clasificación morfológica del óvulo y del espermatozoide y el tipo de ruptura.


32. Guardar los óvulos en placas de cultivo Global Total, previamente marcada con el nombre de la paciente en la parte debajo de la misma con el lápiz de punta de diamante y equilibrado por lo menos 4 horas antes en la incubadora 37°C y 6.5% CO₂.

33. Numerar los óvulos recién procesados, conforme está en el formulario y colocar la placa en la incubadora designada para la paciente a 37°C, 5% O₂ y 6.5% CO₂.

13.2.3. Casos de Semen Díficil

1. En los casos de muestras de semen con elevada concentración de espermatozoides inmóvil, no depositar el esperma en la gota de PVP, sino en una o varias gotas de medio Global Collect suplementado al 10% con Global Protein Supplement, con o sin pentoxifilina dependiendo del aspecto general de la muestra.
2. Capturar los espermatozoides que respondan a la pentoxifilina y colocarlos en una gota limpia de PVP, en posiciones donde sea fácil encontrarlos, alcanzándoles el flagelo para inmovilizar. Cuando se tenga el número suficiente de espermatozoides para que los óvulos a inseminar, retirar los óvulos de la incubadora, para proceder a su microinyección.

14. CLASIFICACIÓN DE LA INYECCIÓN

	INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA ICSI		Código	
			PS-DC-026	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 7 de 8

Tipo	Descripción
SS (Sin Salto)	Sin hacer presión sobre la membrana se forma un cono, la membrana rompe y desliza por los lados de la pipeta de inyección. Este tipo de ruptura se da en óvulos de mala calidad y tienden a degenerar.
A1	Una vez formado el cono, continuar presionando hasta que la membrana se rompa y deslice por los lados de la pipeta. Aspirar entonces un poco de citoplasma, para asegurar que la membrana se rompe (al aspirar las paredes del cono no se mueven) e inyectar el espermatozoide.
A2	Se da la ruptura antes de que el citoplasma aspirado dentro de la pipeta alcance la región de la zona pelúcida.
A3	Se da la ruptura después de que el citoplasma aspirado alcance la región de la zona pelúcida.
Stirring	La membrana no se rompe por presión después de introducir profundamente la pipeta en el interior del óvulo, se debe retirar la pipeta de inyección muy lentamente y volver a introducirla en el citoplasma por un punto inmediatamente superior / inferior al que se introdujo la pipeta por primera vez.

Tabla 2. Tipos de ruptura de la membrana plasmática del óvulo.

15. CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ÓVULOS


Un óvulo normal es aquel con estructura esférica, ooplasma translúcido libre de cuerpos extraños (vacuolas, REL, otros), y un cuerpo polar de tamaño apropiado. Los parámetros para tener en cuenta en la evaluación del óvulo son:

Estructura del Óvulo	Observaciones
Cuerpo Polar - CP	Intacto (OK)
	Fragmentado (Frag)
	Irregular (Irreg)
Citoplasma	Granuloso (Gran)
	Vacuolas (Vac)
	Retículo Endoplasmático Liso (REL)
Espacio Perivitelino - EPV	Aumentado (EPV↑)
	Con material o Debris (Debris)
	Tabicado
Zona Pelúcida - ZP	Gruesa
	Fina
	Oscura

Tabla 3. Parámetros de referencia para descripción morfológica de óvulos.

16. ACCIONES CORRECTIVAS EN CASO DE NO CONFORMIDADES

- Si un espermatozoide o un óvulo se pega a la punta de la pipeta, mover la placa de ICSI para que la tensión del medio / aceite ayude a separarlos.

	INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA ICSI		Código	
			PS-DC-026	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 8 de 8

- Si la pipeta de inyección llega a estar muy sucia, descender hasta el fondo de la placa y mover suavemente la platina, hasta que la pipeta salga por la posición de tres en punto. Repetir varias veces.
- Si el óvulo se suelta de la pipeta Holding antes de sacar la pipeta de inyección de su interior, mover suavemente la platina, de modo que la pipeta quede situada en la dirección de las tres en punto, desplazándola hasta el final de la gota. Llegando aquí, el óvulo permanece en la gota (no puede acompañar la pipeta) mientras que la pipeta de inyección sale en su totalidad.
- Al descender las pipetas más de lo normal y desenfocarlas, es posible que los ángulos de estas quedan por debajo de las puntas. Volver a subir las pipetas y ajustar la posición (ángulos por encima de las puntas).

17. CONTROL DE CALIDAD

- Todos los medios utilizados deberán someterse a un análisis de endotoxinas, que en este laboratorio los medios ya deben reportar este análisis cuando son comprados.
- La incubadora utilizada se monitoriza diariamente con respecto al CO₂, O₂ y la temperatura.
- Todo el equipo de micromanipulación debe estar correctamente alineado y posicionados a la máxima estabilidad. Se recomienda que se mantenga lejos de locales o equipos que puedan generar vibración (puertas, ascensores, corrientes de aire, etc.).
- Todos los equipos utilizados (incubadoras, filtros de cámaras de flujo laminar, estereoscopio, microscopios, etc.) deberán someterse a una revisión / calibración anual por representantes acreditados.
- Todo el manejo de óvulos, incluyendo la inyección, se realiza en superficies calientes (36.5 – 37.0°C).
- La osmolaridad y el pH de los medios son mantenidos por la parafina, que impide la evaporación de las gotas de cultivo / inyección.
- El embriólogo que realiza la técnica fue previamente entrenado para este procedimiento.