



**COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ESPERMATOZOIDES FRESCOS Y CRIOPRESERVADOS PROVENIENTES DE PACIENTES AZOOSPÉRMICOS OBSTRUCTIVOS Y SECRETORES UTILIZANDO LA TÉCNICA DE INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE UN ESPERMATOZOIDE (ICSI).**

**COMPARATIVE EFFICIENCY OF FRESH AND CRYOPRESERVED SPERMATOZOA FROM PATIENTS WITH OBSTRUCTIVE AND AZOOSPERMIA, USING INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI).**

Artículo de revisión

Revision article

**Dres. Brugo-Olmedo, S., M.D.\*; De Vincentiis, S., M. Sc.\*\*; Urrutia, F., M.D.\*; Nodar, F., M. Sc.\*\*\*; Acosta, A. A., M.D.\***

**RESUMEN:** *Antecedentes:* El uso de espermatozoides criopreservados epididimarios/testiculares, es un procedimiento rutinario de los Laboratorios de Reproducción Asistida. El objetivo de este trabajo fue comparar la eficiencia de espermatozoides frescos y criopreservados de pacientes que presentaban azoospermia obstructiva y secretora, cuando fueron utilizados en la técnica de ICSI.

**Métodos:** Análisis retrospectivo de casos. Fueron realizados 48 (55,8%) y 38 (44,2%) de 86 Ciclos de pacientes Azoospermicos Obstructivos (OAC) utilizando espermatozoides frescos (F) y criopreservados (C), respectivamente. Setenta y uno de 109 (65,1%) Ciclos de pacientes Azoospermicos Secretores (SAC) realizados con espermatozoides F, fueron programados durante el mismo período, pero sólo en 43 de los 71 (60,6%) se hallaron espermatozoides; en 38 de 109 SAC (34,9%), se utilizó una muestra de espermatozoides criopreservada con anterioridad. Se analizaron la tasa de fertilización normal, la calidad embrionaria y las tasas de implantación, embarazo clínico y aborto.

**Resultados:** Las mujeres del grupo F-SAC fueron significativamente más jóvenes que aquéllas del grupo C-SAC ( $30,87 \pm 3,8$  años vs.  $32,5 \pm 3,7$  años,  $p = 0,039$ ). Las tasas de fertilización normal, embarazo, implantación y aborto no mostraron diferencias cuando fueron utilizados espermatozoides F y C en pacientes azoospermicos obstructivos y secretores. Llamativamente, los embriones obtenidos en el grupo F-SAC presentaron significativamente mejor calidad embrionaria que aquéllos del grupo C-SAC (72,8% vs. 49,6% de embriones Clase III-IV,  $p = 0,0032$ ).

**Conclusión:** Se obtienen similares resultados con el uso de espermatozoides frescos o criopreservados en pacientes obstructivos y secretores, en términos de tasa de fertilización, embarazo clínico, implantación y aborto.

(Rev. Arg. de Urol., Vol. 66, N° 4, Pág. 187, 2001)

**Palabras clave:** Azoospermia; Espermatozoides frescos y criopreservados; ICSI/PESA/TESE.

**SUMMARY: Background:** Use of frozen-thawed epididymal/testicular spermatozoa is a routine procedure in Assisted Reproduction Laboratories. The purpose of this study was to compare fresh and cryopreserved sperm efficiency in patients with obstructive and azoospermia when used in ICSI.

**Methods:** Retrospective case analysis. Forty-eight (55.8%) and 38 (44.2%) out of 86 Obstructive Azoospermic Cycles (OAC) were performed using fresh (F) and cryopreserved (C) spermatozoa respectively. Seventy-one out of

Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGyR),  
Viamonte 1438, (1055) Buenos Aires, Argentina.

\* sbo@cegyr.com

\*\* sdv@cegyr.com

\*\*\* fnodar@cegyr.com

109 (65.1%) Non-obstructive Azoospermic Cycles (SAC) using F sperm, were scheduled during the same period of time but only in 43 out of the 71 (60.6%) spermatozoa were found; in 38 out of 109 SAC (34.9%), a previously cryopreserved sample was used. Normal fertilization rate, embryo quality, implantation, clinical pregnancy and miscarriage rates were analyzed.

**Results:** Females in F-SAC group were significantly younger than in C-SAC ( $30.87 \pm 3.8$  years vs.  $32.5 \pm 3.7$  years,  $p = 0.039$ ). Normal fertilization, pregnancy, implantation and miscarriage rates were not significantly different when F and C spermatozoa were used in obstructive and Non-obstructive azoospermic patients. Interestingly, embryos obtained from F-SAC presented significantly better morphology than those from C-SAC (72.8% vs. 49.6% Class III-IV embryos,  $p = 0.0032$ ).

**Conclusion:** The use of fresh or cryopreserved spermatozoa in obstructive and Non obstructive azoospermic patients, renders similar results in terms of fertilization, pregnancy, implantation and miscarriage rates.

(Rev. Arg. de Urol., Vol. 66, Nº 4, Pág. 194, 2001)

**Keywords:** Azoospermia; Fresh and cryopreserved spermatozoa; ICSI / PESA / TESE

## INTRODUCCIÓN

Las técnicas de Inyección Intracitoplasmática de un Espermatozoide (ICSI), Aspiración Percutánea Epididimaria (PESA) y Extracción Espermática Testicular (TESE) han permitido que, hombres con muy pocos o ningún espermatozoide presentes en el eyaculado (Devroey y col., 1995; Tournaye y col., 1995; Craft y col., 1995; Devroey y col., 1996; Kahraman y col., 1996; Silber y col., 1996; Van Steirteghem y col., 1998) tengan la capacidad de tener hijos. Más aún, informes previos demostraron que la combinación de las técnicas de IVF-ICSI con TESE en pacientes azoospermicos brindan resultados similares a aquellos obtenidos con pacientes que presentan una espermatogénesis normal (Devroey y col., 1995; Tournaye y col., 1995; Devroey y col., 1996; Kahraman y col., 1996; Silber y col., 1996).

Recientemente, fueron analizados los resultados obtenidos en términos de embarazo clínico, implantación y aborto con la transferencia de embriones obtenidos luego del uso de espermatozoides criopreservados en este tipo de pacientes. Se han comunicado buenas tasas de embarazo obtenidas tanto en pacientes azoospermicos obstructivos (Romero y col., 1996; Fischer y col., 1996) como secretores (Podsiadly y col., 1996) con el uso de espermatozoides criopreservados.

Se ha comunicado que las tasas de fertilización, embarazo, implantación y nacidos vivos, son más bajas cuando se utilizan espermatozoides criopreservados comparadas con espermatozoides frescos (Hovatta y col., 1996; De Croo y col., 1998; Verheven y col., 1997).

Por otro lado, la mayoría de los informes concernientes al uso de espermatozoides criopreservados provenientes de pacientes azoospermicos obstructivos y secretores en ICSI, demostraron que los espermatozoides criopreservados pueden actuar tan bien como

los espermatozoides frescos (Gil-Salom y col., 1996; Friedler y col., 1997; Palermo y col., 1999; Prins y col., 1999).

A pesar de que la técnica de criopreservación de espermatozoides epididimarios/testiculares es de uso rutinario en los Laboratorios de Reproducción Asistida, los resultados de la técnica de ICSI combinada con PESA/TESE utilizando espermatozoides criopreservados, permanecen en el campo de lo controvertido.

Para responder esta pregunta, nosotros comparamos los resultados obtenidos en pacientes azoospermicos obstructivos y secretores, utilizando tanto espermatozoides frescos como criopreservados.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en una Clínica privada de alta complejidad de reproducción asistida con afiliación Universitaria.

### **Pacientes:**

**Azoospermia obstructiva:** El presente estudio, conducido entre enero de 1994 y julio de 2000, involucra los resultados obtenidos en 86 ciclos consecutivos correspondientes a 84 pacientes que presentaban Azoospermia Obstructiva (OAC). Cuarenta y ocho (55,8%) y 38 (44,2%) ciclos fueron realizados utilizando espermatozoides frescos y criopreservados, respectivamente. Los espermatozoides fueron obtenidos con la técnica de PESA en 54 ciclos (30 frescos y 24 criopreservados) y a través de la técnica de TESE en 32 ciclos (18 frescos y 14 criopreservados).

**Azoospermia secretora:** Se evaluaron los resultados obtenidos en 109 ciclos consecutivos de pacientes azoospermicos secretores (SAC) correspondientes a 106 parejas durante el mismo período. Los espermatozoides se obtuvieron mediante la técnica de TESE en

todos los casos. Setenta y un (65,1%) ciclos fueron programados para ser realizados con espermatozoides frescos, pero en sólo 43 de ellos (60,6%) se hallaron espermatozoides. Aquellos ciclos en que no se encontraron espermatozoides fueron cancelados sin realizar la aspiración folicular. Treinta y ocho de 109 SAC (34,9%) fueron realizados utilizando una muestra críopreservada con anterioridad. Un ciclo se canceló debido a la recuperación de muy escasos espermatozoides y todos ellos inmóviles luego del descongelamiento.

#### **Procedimientos de los pacientes**

**Estimulación ovárica:** La supresión ovárica se comenzó en la fase media lútea del ciclo menstrual previo utilizando una inyección subcutánea diaria de agonista de GnRH (GnRHa) (Leuprolide acetato 1-0,5 mg/día). Para evaluar la supresión ovárica, se realizó una ecografía transvaginal y se determinó el nivel sérico de  $E_2$  luego de 10 días de uso del análogo (día 3 del ciclo). Cuando el nivel de  $E_2$  fue  $< 30$  pg/ml y no se observó actividad ovárica a través de la ecografía, comenzó la estimulación ovárica utilizando 300 UI/día de hMG, FSH, FSH recombinante o una combinación de ellos. Cuando al menos 2 folículos alcanzaron 17 mm de diámetro, las pacientes se inyectaron subcutáneamente 10.000 UI de hCG. La aspiración folicular se realizó transvaginalmente 34 horas más tarde por aspiración transvaginal ecográfica bajo anestesia general.

**Aspiración percutánea epididimaria de espermatozoides (PESA):** Se utilizó el método descrito por *Craft* y *colaboradores* con pequeñas modificaciones<sup>(2)</sup>. En breve, la PESA se efectuó bajo anestesia local usando por lo menos 4 jeringas de 1 ml por epidídimo. Cada jeringa, conectada a una aguja de 21 g, contenía 0,3 ml de H-HTF (H-HTF, Irvine Scientific Laboratories, Santa Ana, CA, U.S.A.) suplementado con 1% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Laboratories, St. Louis, MO, U.S.A.). Se procedió a la inmovilización de los testículos con el dedo índice y el pulgar de la mano izquierda del cirujano y se dirigió cada jeringa hacia la cabeza o el cuerpo del epidídimo. Se procedió a aspirar varias veces con cada una de las jeringas y se detuvo la succión, aunque no se observara fluido precedente del epidídimo. Todas las jeringas fueron enviadas inmediatamente al laboratorio. Se colocó la suspensión en una cápsula de Petri (*Falcon, Beckton y Dickinson*, Lincoln Park, NJ, catálogo 3652), se agregó 1 ml de H-HTF suplementado con 1% BSA y una gota de esta suspensión fue observada al microscopio invertido (Nikon Diaphot, Nikon Corporation, Tokyo, Japón) con platina térmica (Nikon Corporation, Tokyo, Japón) para evaluar la presencia de espermatozoides. Posteriormente, la suspensión se colocó en un tubo de 15 ml (*Falcon, Beckton y Dickinson*, Lincoln Park, NJ, catálogo 2196), se centrifugó 5 minutos a 1.600 r.p.m., el pellet se resuspendió en 100-500  $\mu$ l de H-HTF su-

plementado con 1% de BSA y se incubó en estufa con 5%  $CO_2$ , 5%  $O_2$ , 90%  $N_2$ , 37°C y humedad a saturación, hasta su uso.

**Extracción espermática testicular (TESE):** Se realizaron biopsias testiculares múltiples utilizando anestesia local. El tejido testicular se colocó en tubos (*Falcon, Beckton y Dickinson*, Lincoln Park, NJ, catálogo 2001) con 2 ml de H-HTF suplementado con 1% BSA que se enviaron al laboratorio. El tejido obtenido se disgregó con la ayuda de 2 portaobjetos estériles en un cápsula de *Petri* pequeña. Luego se observó el tejido testicular al microscopio invertido con platina térmica buscando la presencia de espermatozoides. Se agregó 1 ml de H-HTF suplementado con 1% BSA. Esta suspensión se centrifugó 5 minutos a 1.600 r.p.m. y el pellet se resuspendió en 100-500  $\mu$ l de H-HTF suplementado con 1% BSA. La suspensión fue nuevamente observada bajo microscopio e incubada en estufa (5%  $CO_2$ , 5%  $O_2$ , 90%  $N_2$ , humedad a saturación a 37°C) hasta su uso.

**Suplementación de la fase lútea:** La fase lútea fue suplementada utilizando progesterona en tabletas micro-nizadas de manera diaria (Utrogestan, Rontag, Paris, Francia), progesterona en gel (Crinone, Serono, México) o progesterona intramuscular (Proluton, Schering, Buenos Aires, Argentina) comenzando el día siguiente a la aspiración folicular.

**Diagnóstico de embarazo:** Dos semanas posteriores a la transferencia de los embriones se realizó la determinación de los niveles séricos de  $\beta$ -HCG y cuatro semanas posteriores a la transferencia se realizó una ecografía transvaginal (6 semanas de edad gestacional). Las gestaciones que presentaron latido cardíaco al momento del ultrasonido se identificaron como Embarazos Clínicos (CP). La tasa de aborto (AR) fue definida como el porcentaje de pacientes embarazadas que abortaron todos los sacos implantados y la Tasa de Aborto Parcial (PAR) se definió como el porcentaje de pacientes embarazadas que abortaron algunos de los sacos implantados en gestaciones múltiples, pero que aún presentaban un embarazo en curso.

**Consentimientos:** Todas las parejas firmaron un consentimiento escrito para cada uno de los procedimientos realizados (ICSI, PESA, TESE, criopreservación de espermatozoides, congelamiento de ovocitos pronucleados y criopreservación de embriones). Como se trata de un análisis retrospectivo, no se necesitó aprobación del Comité de Ética.

**Screening genético:** A todas las parejas que realizaron ICSI previo al tratamiento se efectuó un cariotipo en sangre periférica.

## **Procedimientos del Laboratorio**

**Criopreservación de espermatozoides testiculares y epididimarios:** Se utilizó la técnica descrita por *Romero y colaboradores* en 1996<sup>(12)</sup> con una pequeña modificación. Brevemente, la suspensión espermática se diluyó 1:1 en un medio crioprotector con glicerol (*Test York Buffer, Irvine Scientific*, Santa Ana, CA, catálogo 9971) que se añadió lentamente. Luego de homogeneizarlo suavemente, se realizaron gotas de aproximadamente 100 µl sobre una superficie de hielo seco utilizando una pipeta *Pasteur*. El congelamiento de las pastillas ocurrió en menos de 1 minuto y fueron colocadas en crioviales de 1,2 ml (*Costar, Biofreeze Vial*, Catálogo 2012) previamente enfriados, y directamente sumergidos en nitrógeno líquido (-196°C) y almacenados.

**Descongelamiento de espermatozoides testiculares y epididimarios:** Al menos 2-3 pastillas se remueven del nitrógeno líquido, dependiendo de la cantidad de espermatozoides encontrados (número de espermatozoides por campo) antes de la criopreservación. Se coloca a las pastillas en un tubo de 15 ml (*Falcon, Beckton y Dickinson*, Lincoln Park, NJ, catálogo 2196) y luego de 5 minutos, se agregan 2 ml de H-HTF-1% BSA muy lentamente. Se homogeniza la suspensión y se la centrifuga por 5 minutos, a 1.600 r.p.m. Se remueve el sobrenadante y el pellet se resuspende en 100-500 µl de H-HTF + 1% BSA. Si el número de espermatozoides observado en este punto fuera considerado insuficiente, se procede a descongelar más pastillas de la forma en que se indicó. La suspensión final de espermatozoides se incubó en la estufa gaseada hasta su uso.

**Espermatozoides inmóviles:** Cuando solamente había presentes espermatozoides inmóviles, tanto en muestras frescas como criopreservados provenientes de pacientes azoospermicos obstructivos y secretores, las muestras fueron incubadas en 3 mM-pentoxifilina por 30 minutos a 37°C en estufa gaseada, luego de este tiempo se agregaron 2 ml de H-HTF suplementado con 1% BSA; la muestra se centrifugó 5 minutos a 1.600 r.p.m. y se resuspendió en 100-500 µl del mismo medio. Este procedimiento se realizó cerca del momento de inyectar a los ovocitos para que el efecto de la pentoxifilina estuviera todavía presente.

**Laboratorio de embriología:** Los ovocitos se recuperaron utilizando una lupa estereoscópica (*Nikon SMZ-10*) con una platina térmica adosada (*Analís Anatherm II electronic AZ vub 05781*) y en cápsulas de 100 x 20 mm (*Falcon, Beckton y Dickinson*, Lincoln Park, NJ, catálogo 3003). Luego, los ovocitos fueron colocados en cápsulas de 60 x 15 mm (*Falcon, Beckton y Dickinson*, Lincoln Park, NJ, catálogo 3652) con 8 ml H-HTF suplementado con 1% de BSA y cubierto con 5 ml de aceite mineral pre-equilibrado (*Squibb NDC 000 3-0559-52, Squibb and Sons, Princeton, NJ 0854 0*

U.S.A.). Esta cápsula fue colocada sobre una platina térmica a 37°C (*Thermostat Lab-Line Instruments, Inc., Designers and Manufacturers, Melrose Park Ill., U.S.A.*) durante toda la aspiración. Cuando la punción concluyó, se colocó a los ovocitos en pequeños tubos *Falcon* (*Falcon, Beckton y Dickinson*, Lincoln Park, NJ, catálogo 2003) con 1 ml de *Human Tubal Fluid* (HTF), (*Irvine Scientific*, Catálogo 09962) suplementado con 15% de suero sintético sustituto (SSS), (*Irvine Scientific*, Catálogo 99193). En cada tubo fueron colocados no más de 4-6 ovocitos. Los tubitos fueron mantenidos en la estufa gaseada (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, a 37°C) por 2-3 horas para que se equilibren.

**ICSI:** Los complejos de ovocitos y células acompañantes fueron tratados con 80 UI/ml de hialuronidasa (H-3757, *Sigma Laboratories*, Saint Louis, MO, U.S.A.) por 30 segundos. Inmediatamente, los ovocitos fueron transferidos a gotas de H-HTF-1% BSA para remover las células de la granulosa y del cúmulus. La madurez nuclear de los ovocitos se evaluó en el microscopio invertido y se guardaron en la estufa gaseada por 2 horas o más, en HTF suplementado con 15% SSS hasta el momento de la inyección. Los Metafase II fueron colocados en gotas de 5 µl de H-HTF-1% BSA bajo aceite mineral pre-equilibrado (*Squibb NDC 000 3-0559-52, Squibb and Sons, Princeton, NJ 0854 0 U.S.A.*). El ICSI se realizó luego de 6-8 horas de finalizada la aspiración folicular utilizando un microscopio invertido (*Nikon Diaphot, Nikon Corporation, Tokyo, Japón*) con micromanipuladores *Narishige* (*Nikon Corporation, Tokyo, Japón*) sobre platina térmica. Luego de finalizado el ICSI, los ovocitos se colocaron de manera individual en gotas de 25 µl HTF -15% SSS cubiertas de aceite mineral pre-equilibrado y se los incubó en estufa gaseada hasta la visualización de los pronúcleos 12-18 horas post-inyección. Veinticuatro o 48 horas después, fueron evaluados la calidad embrionaria y el clivaje.

**Calidad embrionaria y clivaje:** Se aplicó el siguiente criterio para la evaluación de los embriones: los embriones que presentan > 50% de su superficie cubierta por fragmentos, blastómeras irregulares y baja velocidad de clivaje son clasificados como embriones Clase I; aquéllos con blastómeras más uniformes y > 50% de fragmentos son embriones Clase II; los embriones Clase III presentan ≤ 50% de su superficie cubierta con fragmentos, blastómeras desiguales y clivaje normal; aquéllos Clase IV presentan blastómeras de igual tamaño, ningún fragmento y clivaje normal. En todos los casos, la cantidad de blastómeras fue determinada y registrada. Los embriones supernumerarios fueron criopreservados utilizando un protocolo lento de congelamiento.

**Transferencia embrionaria:** La transferencia transcr-

vical embrionaria fue realizada a las 48 o 72 horas luego de realizada la aspiración folicular utilizando HTF suplementado con SSS y cánulas de Frydman (Prodi-med, Neuilly, Francia).

**Estadística:** Los grupos OAC y SAC F/C fueron comparados utilizando el t-test (edad femenina y masculina, número de ovocitos obtenidos, MII obtenidos e inyectados y número medio de embriones obtenidos y transferidos). Las diferencias en los porcentajes de fertilización normal (2 pn) y anormal (1, 3 o más pn), buena calidad embrionaria, embarazo clínico, (CPR), implantación (IR) y aborto (MR) fueron comparadas utilizando el test de Fisher.

## RESULTADOS

**OAC:** Dado que los espermatozoides frescos y criopreservados de los pacientes del grupo OAC (F-OAC y C-OAC) fueron obtenidos por 2 métodos diferentes (PESA y TESE), las poblaciones y los resultados de estos grupos fueron comparados entre F-PESA vs. C-PESA y F-TESE vs. C-TESE y luego entre F-PESA vs. F-TESE y C-PESA vs. C-TESE. Como no se encontraron diferencias significativas entre estos subgrupos (Tabla

1), para fines prácticos, nosotros analizamos los grupos F-PESA/TESE-OAC y C-PESA/TESE-OAC como únicos grupos (F-OAC y C-OAC). No se encontraron diferencias significativas en la edad femenina ni masculina. El número total de ovocitos y Metafase II (MII) obtenidos fue de 1.221 y 735, respectivamente. La media de ovocitos totales y de MII obtenidos por paciente tampoco mostró diferencias. Cuatrocientos dieciocho y 317 MII fueron inyectados utilizando espermatozoides frescos y criopreservados, respectivamente. Fue necesario utilizar pentoxifilina para inducir movilidad en 3 de 48 (6,3%) y en 24 de 38 (63,2%) ciclos frescos y criopreservados, respectivamente. Todos los MII fueron inyectados con espermatozoides móviles. Las tasas de fertilización normal y anormal no fueron diferentes cuando se comparó F-OAC vs. C-OAC (Tabla 2).

La tasa de clivaje fue de 96,1% en F-OAC y de 97,2% en C-OAC. Dos ciclos en el grupo de F-OAC (4,2%) no tuvieron transferencia embrionaria: un caso (2 ovocitos inyectados) presentó Falla Total de Fertilización (TFF) y en el otro caso se criopreservaron todos los embriones debido a hiperestimulación de la paciente. En el grupo de C-OAC, 2 ciclos (5,3%) no tuvieron transferencia: un caso tuvo un único ovocito obtenido y no fertilizó y el otro caso tuvo 3 embriones que detuvieron su desarrollo en el estadio de singamia y no fue-

|   | F-PESA     | C-PESA      | F-TESE     | C-TESE     | valor de p | Test   |
|---|------------|-------------|------------|------------|------------|--------|
| Número de ciclos realizados                   | 30         | 24          | 18         | 14         |            |        |
| Edad femenina (años)                          | 31,4 ± 5,9 | 29,4 ± 4,1  | 32,4 ± 4,5 | 31,6 ± 5,9 | NS *       | t-test |
| Edad masculina (años)                         | 32,3 ± 3,8 | 32,9 ± 4,6  | 35,7 ± 1,2 | 34,2 ± 5,8 | NS *       | t-test |
| Ovocitos obtenidos por paciente               | 13,1 ± 7,4 | 15,3 ± 11,2 | 14,7 ± 8,4 | 13,9 ± 9,5 | NS *       | t-test |
| MII obtenidos/paciente                        | 7,9 ± 3,6  | 8,6 ± 6,2   | 9,6 ± 5,7  | 9,3 ± 4,3  | NS *       | t-test |
| MII inyectados/paciente                       | 7,9 ± 3,6  | 7,1 ± 3,4   | 10,3 ± 5,9 | 8,9 ± 3,5  | NS *       | t-test |
| % fertilización normal                        | 64,1%      | 65,2%       | 61,9%      | 62,3%      | NS *       | Fisher |
| Número de embriones obtenidos por paciente    | 4,4 ± 2,5  | 4,2 ± 2,4   | 4,2 ± 3,0  | 4,8 ± 2,6  | NS *       | t-test |
| Número de embriones transferidos por paciente | 3,1 ± 1,4  | 2,5 ± 0,7   | 3,2 ± 1,6  | 3,1 ± 1,2  | NS *       | t-test |
| CPR/transferencia                             | 46,4%      | 42,1%       | 27,3%      | 61,5%      | NS *       | Fisher |
| IR  | 20,4%      | 21,3%       | 10,4%      | 25,0%      | NS *       | Fisher |
| % total de abortos                            | 23,1%      | 25,0%       | 0,0%       | 37,5%      | NS *       | Fisher |
| % de sacos abortados                          | 21,1%      | 20,0%       | 0,0%       | 27,3%      | NS *       | Fisher |

Nota: Los valores están expresados como la media ± Desvío Estándar.

NS: no significativo.

La media es significativa al nivel de 0,05.

\* sin diferencias significativas entre los grupos de F-PESA, C-PESA, F-TESE y C-TESE.

Tabla 1: Resultados obtenidos en pacientes Azoospermicos Obstructivos dependiendo del sitio de obtención.

|  | F-OAC           | C-OAC           | valor de p |
|--|-----------------|-----------------|------------|
| Número de ciclos realizados                    | 48              | 38              |            |
| Número de ciclos con transferencia embrionaria | 46              | 36              |            |
| Edad femenina (años)                           | 31,8 ± 4,4      | 30,6 ± 5,0      | NS *       |
| Edad masculina (años)                          | 33,4 ± 3,9      | 34,0 ± 5,5      | NS *       |
| Ovocitos obtenidos por paciente                | 13,6 ± 7,5      | 14,9 ± 10,2     | NS *       |
| MII obtenidos/paciente                         | 8,2 ± 4,9       | 9,2 ± 5,5       | NS *       |
| MII inyectados/paciente                        | 8,7 ± 4,5       | 8,3 ± 4,2       | NS *       |
| % fertilización normal                         | 62,4% (261/418) | 64,7% (205/317) | NS *       |
| % fertilización anormal                        | 2,6% (11/418)   | 4,7% (15/317)   | NS *       |

Nota: Los valores están expresados como la media ± Desvío Estándar.

NS: no significativo.

La media es significativa al nivel de 0,05.

\* F-OAC vs. C-OAC

Tabla 2: Resultados globales obtenidos en F-OAC y C-OAC.

ron transferidos. No se observaron diferencias en el número de embriones obtenidos ni transferidos, ni tampoco en el porcentaje de embriones de buena calidad obtenidos y transferidos. La CPR y IR no mostraron diferencias significativas entre los grupos comparados. La tasa de aborto, aunque es mayor en el grupo de C-OAC (17,6% -3 de 17 embarazos- vs. 27,8% -5 de 18 embarazos-), no alcanzó significancia estadística (Tabla 3).

**SAC:** No se encontraron diferencias significativas en la edad promedio masculina, cuando se comparó F-SAC vs. C-SAC, pero la edad promedio femenina fue significativamente menor en el grupo de F-SAC (30,9 ± 3,7 vs. 32,5 ± 3,7 años, respectivamente,  $p = 0,0396$ ); la significación biológica de esta diferencia puede ser irrelevante. Fueron obtenidos un total de 924 ovocitos. La media de ovocitos obtenidos, MII obtenidos e inyectados por paciente, no fue diferente. Se utilizó pentoxifilina en 13 de 43 (30,2%) y en 29 de 38 (76,3%) ciclos con espermatozoides frescos y criopreservados, respectivamente. Veintisiete MII fueron inyectados utilizando espermatozoides inmóviles luego del tratamiento con pentoxifilina: 3 del grupo F-SAC y 24 del grupo C-SAC; esto representa una diferencia considerable entre estos dos grupos. A pesar de este hecho, las tasas de fertilización normal y anormal fueron similares (Tabla 4).

La tasa de clivaje fue de 99,3% en el grupo de F-SAC y 94,4% en C-SAC. Cuatro ciclos correspondientes al grupo de F-SAC (9,3%) no tuvieron transferencia embrionaria: dos presentaron TFF y los otros dos ovocitos fertilizados anormalmente. En el grupo de C-SAC 4 ciclos (8,9%) no tuvieron transferencia embrionaria debido a TFF.

La media de embriones obtenidos y transferidos no fue diferente significativamente. Aquellos embriones obtenidos utilizando espermatozoides frescos testiculares presentaron significativamente mejor calidad embrionaria que aquellos que se lograron en el grupo C-SAC (72,8% vs. 49,6%,  $p = 0,0001$ ). Lo mismo ocurrió con los embriones transferidos (76,2% vs. 57%,  $p = 0,0032$ ). Sin embargo, las tasas de CPR y IR no fueron diferentes estadísticamente (43,6% y 22,8% en F-SAC vs. 42,4% y 18,4% en C-SAC, respectivamente) (Tabla 5) indicando quizás que no existe una significancia biológica en la diferencia de la calidad embrionaria identificada. Las tasas de aborto fueron similares estadísticamente (35,3% -6 de 17 embarazos- vs. 14,3 -2 de 14 embarazos- en F-SAC y C-SAC, respectivamente).

## DISCUSIÓN

Cuando se trabaja con espermatozoides eyaculados, el método de obtención de la muestra (masturbación, eyaculación retrógrada, electroestimulación) y las diferencias en la calidad espermática (excepto para el caso de necrozoospermia), no afectan significativamente los resultados obtenidos en ICSI; esto parece repetirse para aquellos casos de espermatozoides obtenidos de diferentes áreas del tracto genital masculino en pacientes azoospermicos.

La criopreservación de espermatozoides es un procedimiento que preserva la porción de muestra que no se utiliza cuando la recuperación de espermatozoides a través de técnicas quirúrgicas (PESA, MESA, TESE) es obligatoria y aumenta la posibilidad de la pareja de

|   | F-OAC          | C-OAC          | valor p |
|---|----------------|----------------|---------|
| Número de embriones obtenidos por paciente                      | 4,2 ± 2,3      | 4,8 ± 2,9      | NS *    |
| Número de embriones transferidos por paciente                   | 3,3 ± 1,5      | 2,8 ± 1,1      | NS *    |
| % de embriones Clase III-IV obtenidos                           | 57% (111/195)  | 52,8% (93/176) | NS *    |
| % de embriones Clase III-IV transferidos                        | 59,9% (91/152) | 60,4% (64/106) | NS *    |
| Números de ciclos con transferencia embrionaria                 | 46             | 36             |         |
| CPR/ciclo aspirado  | 35,4% (17/48)  | 47,4% (18/38)  | NS *    |
| CPR/transferencia   | 36,9% (17/46)  | 50% (18/36)    | NS *    |
| % de embarazos simples  | 70,6% (12/17)  | 72,2% (13/18)  | NS *    |
| IR  | 15,2% (24/158) | 22,6% (24/106) | NS *    |
| % total de abortos  | 17,6% (3/17)   | 27,8% (5/13)   | NS *    |
| % de sacos abortados  | 16,7% (4/24)   | 20,8% (5/24)   | NS *    |
| AR  | 11,8% (2/17)   | 11,1% (2/18)   | NS *    |
| PAR   | 5,9% (1/17)    | 16,7% (3/18)   | NS *    |
| Número de embarazos evolutivos                                  | 15             | 16             | NS *    |
| % de embarazos aún evolutivos al momento de realizar el estudio | 13,3% (2/15)   | 31,3% (5/16)   | NS *    |
| % de nacidos vivos al momento de realizar el estudio            | 83,3% (15/18)  | 100% (13/13)   | NS *    |

Nota: Los valores están expresados como la media ± Desvío Estándar.

NS: no significativo

La media es significativa al nivel de 0,05.

\* F-OAC vs. C-OAC

Tabla 3: *Resultados globales obtenidos en F-OAC y C-OAC.*

|  | F-SAC           | C-SAC           | valor de p |
|--|-----------------|-----------------|------------|
| Número de ciclos realizados                    | 43              | 37              |            |
| Número de ciclos con transferencia embrionaria | 39              | 33              |            |
| Edad femenina (años)                           | 30,9 ± 3,7      | 32,5 ± 3,7      | 0,0396     |
| Edad masculina (años)                          | 35,6 ± 7,5      | 36,2 ± 4,1      | NS *       |
| Ovocitos obtenidos por paciente                | 11,9 ± 6,9      | 11,1 ± 5,5      | NS *       |
| MII obtenidos/paciente                         | 7,4 ± 4,6       | 7,4 ± 4,1       | NS *       |
| MII inyectados/paciente                        | 6,8 ± 3,7       | 7,1 ± 3,6       | NS *       |
| % fertilización normal                         | 53,6% (165/308) | 51,4% (144/280) | NS *       |
| % fertilización anormal                        | 1,9% (6/308)    | 3,2% (9/280)    | NS *       |

Nota: Los valores están expresados como la media ± Desvío Estándar.

NS: no significativo.

La media es significativa al nivel de 0,05.

\* F-SAC vs. C-SAC

Tabla 4: *Resultados globales obtenidos en F-SAC y C-SAC.*

|   | F-SAC          | C-SAC         | valor de p |
|---|----------------|---------------|------------|
| Número de embriones obtenidos por paciente                      | 3,4 ± 2,3      | 3,4 ± 2,1     | NS *       |
| Número de embriones transferidos paciente                       | 3,3 ± 2,1      | 2,6 ± 1,2     | NS *       |
| % de embriones Clase III-IV obtenidos                           | 72,8%          | 49,6%         | 0,0001     |
| % de embriones Clase III-IV transferidos                        | 76,2%          | 57%           | 0,0032     |
| Números de ciclos con transferencia embrionaria                 | 39             | 33            |            |
| CPR/ciclo aspirado  | 39,5% (17/43)  | 37,8% (14/37) | NS *       |
| CPR/transferencia   | 43,6% (17/39)  | 42,4% (14/33) | NS *       |
| % de embarazos simples  | 52,9% (9/17)   | 78,6% (11/14) | NS *       |
| IR  | 22,8% (28/123) | 18,4% (18/98) | NS *       |
| % total de abortos  | 35,3% (6/17)   | 14,3% (2/14)  | NS *       |
| % de sacos abortados  | 21,4% (6/28)   | 16,7% (3/18)  | NS *       |
| AR  | 23,5% (4/17)   | 14,3% (2/14)  | NS *       |
| PAR   | 11,8% (2/17)   | 0% (0/14)     | NS *       |
| Número de embarazos evolutivos                                  | 13             | 12            | NS *       |
| % de embarazos aún evolutivos al momento de realizar el estudio | 76,4% (13/17)  | 85,7% (12/14) | NS *       |
| % de nacidos vivos al momento de realizar el estudio            | 90,9% (20/22)  | 92,3% (12/13) | NS *       |

Nota: Los valores están expresados como la media :: Desvío Estándar.

NS: no significativo.

La media es significativa al nivel de 0,05.

\* F-SAC vs. C-SAC

Tabla 5: Resultados globales obtenidos en F-SAC y C-SAC.

lograr un embarazo a término sin la necesidad de re-intervenir al varón. Ha sido claramente demostrado que la repetición de biopsias testiculares dentro de un período de 6 meses puede disminuir la posibilidad de recuperar espermatozoides y aumenta el riesgo de crear áreas con desvascularización testicular permanente (Schlegel y col., 1997).

Nuestros resultados, así como otros presentados previamente, (Gil-Salom y col., 1996; Friedler y col., 1997; Palermo y col., 1999; Prins y col., 1999; Ben-Yosef y col., 1999; Tournaye y col., 1999), demuestran que tanto los espermatozoides epididimarios o testiculares frescos o criopreservados recuperados de pacientes azoospermicos obstructivos y secretores, son igualmente eficientes en término de fertilización, así como también de implantación luego de la realización de la técnica de ICSI-PESA/TESE.

Nuestros resultados muestran que no hay diferencias en términos de fertilización, calidad embrionaria, embarazo, implantación y aborto cuando espermatozoides epididimarios o testiculares frescos o criopreservados son utilizados en ICSI en OAC. Estos resultados concuerdan con los presentados por Kahraman y

col., 1996, Tournaye y col., 1999 y otros (Friedler y col., 1998; Silber y col., 1995).

Se demuestra que no existen diferencias cuando los espermatozoides han sido obtenidos del epidídimo o del testículo en OAC y que los resultados son comparables cuando se utilizan espermatozoides frescos o criopreservados.

No han sido publicados demasiados trabajos donde se comparen los resultados de tasas de embarazo en ciclos de ICSI con la utilización de espermatozoides testiculares frescos o criopreservados (Friedler y col., 1997; Maier y col., 1999; Haberman y col., 2000).

A pesar de que fueron comunicados resultados superiores con el uso de espermatozoides frescos en pacientes con azoospermia secretora y se hicieron recomendaciones en contra del uso de espermatozoides testiculares criopreservados (Maier y col., 1999; Witt y col., 1998), nuestros resultados indican que este tipo de espermatozoide se comporta de una manera similar, sea fresco o criopreservado. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por Romero y col., 1996, Prins y col., 1999, Ben-Yosef y col., 1999 y Oates y col., 1997.



Llamativamente, la calidad embrionaria fue significativamente mejor y la tasa de aborto mostró un incremento (aunque no significativo), cuando fueron utilizados espermatozoides frescos; la significancia biológica de este hecho es cuestionable.

La criopreservación de espermatozoides obtenidos de pacientes OAC y SAC no afectó la tasa de fertilización, aunque tuvo un claro efecto deletéreo sobre la movilidad espermática forzando la utilización de la solución de pentoxifilina en un número sustancial de pacientes.

Los resultados presentados aquí, refuerzan la conveniencia de utilizar espermatozoides criopreservados, obtenidos de pacientes azoospermicos obstructivos y secretores, como un procedimiento rutinario en todas las clínicas de alta complejidad de reproducción asistida, dado que no se encuentran diferencias en los resultados del ICSI.

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Ben-Yosef, D.; Leah, Y.; Hauser, R. y col. (1999): Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, *14*, 1794-1801.
2. Craft, I.; Tsigiriotis, M.; Bennett, V. y col. (1995): Percutaneous epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in the management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil. Steril.*, *63*, 1038-1042.
3. De Croo, I.; Van der Elst, J.; Everaert, K. y col. (1998): Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, *13*, 1893-1897.
4. Devroey, P.; Liu, J.; Nagy, Z. y col. (1995): Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, *10*, 1457-1460.
5. Devroey, P.; Nagy, P.; Tournaye, H. y col. (1996): Outcome of intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, *11*, 1015-1018.
6. Fischer, R.; Baukloh, V.; Naether, O. G. y col. (1996): Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular biopsy. *Hum. Reprod.*, *11*, 2197-2198.
7. Friedler, S.; Raziel, A.; Soffer, Y. y col. (1997): Intracytoplasmic sperm injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with non obstructive azoospermia - a comparative study. *Fertil. Steril.*, *68*, 892-895.
8. Friedler, S.; Raziel, A.; Soffer, Y. y col. (1998): The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from patients with obstructive azoospermia - a comparative study. *Hum. Reprod.*, *13*, 1872-1877.
9. Gil-Salom, M.; Romero, J.; Minguez, Y. y col. (1996): Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, *11*, 1309-1313.
10. Haberman, H.; Seo, R.; Cieslak, J. y col. (2000): In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Fertil. Steril.*, *73*, 955-960.
11. Hovatta, O.; Foudila, T.; Sieberg, R. y col. (1996): Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of a frozen-thawed testicular biopsy specimen. *Hum. Reprod.*, *11*, 2472-2473.
12. Kahraman, S.; Ozgur, S.; Alatas, C. y col. (1996): High implantation and pregnancy rates with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, *11*, 673-676.
13. Maier, S. H.; Nesslaner, T.; Sterzik, K. y col. (1999): Fresh sperms are superior for assisted fertilization (ICSI) [Abstract N° 1339] *J. Urol.*, *161*, 346.
14. Oates, R. D.; Mulhall, J.; Burgess, C., y col. (1997): Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, *12*, 734-739.
15. Palermo, G. D.; Schlegel, P. N.; Hariprasad, J. J. y col. (1999): Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum. Reprod.*, *14*, 741-748.
16. Podsiadly, B. T.; Woolcott, R. J.; Stanger, J. D. y col. (1996): Pregnancy resulting from intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved spermatozoa recovered from testicular biopsy. *Hum. Reprod.*, *11*, 1306-1308.
17. Prins, G. S.; Dolgina, R.; Studney, P. y col. (1999): Quality of cryopreserved testicular sperm in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia. *J. Urol.*, *161*, 1504-1508.
18. Romero, J.; Remohí, J.; Minguez, Y. y col. (1996): Fertilization after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Fertil. Steril.*, *65*, 877-879.
19. Schlegel, P. N.; Su, L-M. (1997): Physiologic consequences of testicular sperm extraction. *Hum. Reprod.*, *12*, 1688-1692.
20. Silber, S. J.; Nagy, Z.; Liu, J., y col. (1995): The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection - the genetic implication for male infertility. *Hum. Reprod.*, *10*, 2031-2043.
21. Silber, S. J.; Van Steirteghem, A. C.; Liu, J. y col. (1995): High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum. Reprod.*, *10*, 148-152.
22. Silber, S. J.; Van Steirteghem, A. C.; Nagy, Z. y col. (1996): Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil. Steril.*, *66*, 110-117.
23. Tournaye, H.; Camus, M.; Goossens, A. y col. (1995): Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, *10* (suppl. 1), 115-119.
24. Tournaye, H.; Merdad, T.; Silber, S. y col. (1999): No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum. Reprod.*, *14*, 90-95.
25. Verheyen, G.; Nagy, Z.; Joris, H. y col. (1997): Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro -matured germinal-vesicle stage oocytes. *Fertil. Steril.*, *67*, 74-80.
26. Witt, M. A.; Rhee, E.; Tucker, M. (1998): A case for using fresh epididymal or testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection [Abstract N° 1038]. *J. Urol.*, *159*, 270.