

Fertilización, calidad embrionaria, embarazos clínicos e implantación luego de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides obtenidos de biopsia testicular

Fertilization, embryo quality, clinical pregnancy and implantation after intracytoplasmic injection of spermatozoa obtained from testicular biopsy

Gustavo Frattini¹, Edgardo Andreatta¹, Alfredo Carlos Elena¹, Claudio Distilo¹, Guillermo Landi¹,
Mayra Gómez Vitolo¹, Alicia Pené¹

¹CRECER, Centro de Medicina Reproductiva. San Luis 2176 3º piso, Mar del Plata (7600), Buenos Aires, Argentina.

Introducción: La azoospermia es una de las causas de la infertilidad masculina. La técnica de extracción testicular de espermatozoides (TESE) resulta ser una de las metodologías de mayor implementación para obtener espermatozoides en pacientes con azoospermia. El principal problema observado es la calidad comprometida que muestran las gametas al ser obtenidas por medio de este mecanismo. La técnica de ICSI brinda la posibilidad a estos pacientes de ser padres biológicos. Se ha reportado en pacientes con TESE-ICSI que las tasas de fertilización se encuentran entre el 45-75% y las tasas de embarazo clínico entre 26-57%.

Objetivo: Relacionar la tasa de fertilización y la calidad embrionaria con la tasa de implantación y embarazos clínicos luego de realizar TESE-ICSI en pacientes con azoospermia, en CRECER, Centro de Medicina Reproductiva.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio retrospectivo de 22 ciclos TESE-ICSI, entre enero del 2007 y diciembre del 2011, con transferencia embrionaria (TE) a las 72 horas. Se evaluaron la tasa de fertilización, la calidad embrionaria, la tasa de embarazos clínicos y la tasa de implantación.

Resultados: La tasa de fertilización observada en pacientes con TESE resultó ser menor que en parejas sin factor masculino (CONTROL). En la mayoría de los pacientes de TESE se observaron embriones de buena calidad, en su mayoría G3. Las tasas de implantación y embarazo no mostraron diferencias entre ambos grupos.

Conclusión: La totalidad de los embarazos procedieron de TE con, al menos, un embrión de buena calidad. La tasa de embarazo TESE no presenta diferencia alguna con pacientes de ICSI realizado con espermatozoides eyaculados.

PALABRAS CLAVE: Azoospermia, ICSI, TESE, calidad embrionaria, embarazos.

Introduction: Azoospermia is one cause of male infertility. Testicular sperm extraction (TESE) is one of the more common methodologies to obtain spermatozoa in patients with azoospermia. The main problem observed is the compromised quality of gametes to be obtained through this technique. ICSI provide the opportunity for these patients to be biological parents. It has been reported in TESE-ICSI's patients that fertilization rates are between 45-75% and clinical pregnancy rates are between 26-57%.

Objective: The purpose of this study was to determine the relationships between fertilization rate and embryo quality with implantation rate and clinical pregnancy after performing TESE-ICSI in patients with azoospermia, at CRECER, Reproductive Medicine Center.

Materials and Methods: We performed a retrospective study of 22 TESE-ICSI cycles, between January 2007 and December 2011, with embryo transfer (ET) at 72 hours. We evaluated fertilization rate, embryo quality, clinical pregnancy rate and implantation rate.

Results: The fertilization rate observed in patients with TESE was lower than in couples without male factor (CONTROL). In most TESE patients were observed good quality embryos, most G3. The implantation and pregnancy rates did not differ between groups.

Conclusion: All the pregnancy proceeded from ET of, at least, one good quality embryo. TESE pregnancy rate showed no difference with ICSI patients (CONTROL).

KEY WORDS: Azoospermia, ICSI, TESE, embryo quality, pregnancies.

INTRODUCCIÓN

La infertilidad representa uno de los principales problemas reproductivos que las parejas deben afrontar. Se considera que una tercera parte de estas parejas presentan problemas relacionados con factores masculinos, siendo la azoospermia la responsable de un 10% o más de estos casos^{1,2}. Las causas más comunes de azoospermia son: ausencia u obstrucción de conductos deferentes³, detención del proceso de espermatogénesis⁴ y aneyaculación. Algunos factores masculinos severos requieren de recuperación quirúrgica de espermatozoides de epidídimo o testículo (TESE)¹. En la técnica de TESE, se facilita la remoción de túbulos seminíferos para la obtención de espermatozoides directamente de esta sección⁵. En los tubos seminíferos se produce la espermatogénesis, por lo que podemos encontrar grupos de células en los distintos estadios de maduración (espermatogonias, espermatoцитos primarios, secundarios, espermátides, y espermatozoides), pero no encontraremos espermatozoides totalmente maduros ya que el proceso madurativo culmina en el epidídimo.

La realización de biopsias testiculares trae aparejados dos problemas principales: (a) la motilidad de los espermatozoides frescos obtenidos a menudo es pobre, por lo que la selección de espermatozoides viables se dificulta, y (b) la biopsia produce un efecto perjudicial sobre la espermatogénesis (trauma testicular)⁶.

Teniendo en cuenta lo descripto con anterioridad, en la infertilidad debida a la azoospermia, la paternidad se puede lograr combinando TESE con metodologías de reproducción asistida, como inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)^{7,8,9,10}. El ICSI permite escoger al mejor espermatozoide e introducirlo al interior del citoplasma del ovocito, aunque éste no presente motilidad. Se ha reportado en pacientes con TESE-ICSI que las tasas de fertilización se encuentran entre el 45-75% y las tasas de embarazo clínico por transferencia embrionaria entre el 26-57%^{11,12,13}.

La contribución paterna puede afectar la fertilización, el desarrollo embrionario (efectos paternos tempranos y tardíos¹⁴), la activación genómica y el embarazo clínico¹. El centrosoma del espermatozoide se encuentra directamente relacionado con el desarrollo temprano del embrión¹⁵ y los microtúbulos, extensión del centriolo, son responsables del movimiento nuclear y alineamiento de los pronúcleos¹⁶. Está reportada la asociación entre defectos en el centriolo y la inmovi-

lidad o motilidad no progresiva de espermatozoides¹⁷. Por esto es importante el estudio de la calidad de los embriones producidos por TESE-ICSI.

El objetivo de este trabajo fue relacionar la tasa de fertilización y la calidad embrionaria con la tasa de embarazos clínicos y de implantación luego de realizar TESE-ICSI en pacientes con azoospermia, en CRE-CER, Centro de Medicina Reproductiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Se evaluaron 22 ciclos con TESE-ICSI entre enero del 2007 y diciembre del 2011. Dentro de estos 22 casos, 21 fueron con transferencia embrionaria en fresco. Las parejas presentaban solo factor masculino severo (pacientes azoospermicos con biopsias testiculares que confirmaban la presencia de espermatozoides) con factor femenino normal. Se consideró como CONTROL a pacientes de ICSI realizados con espermatozoides de eyaculado fresco y factor femenino normal (n=58), dentro del mismo período.

TESE

Todos los pacientes masculinos fueron ingresados a quirófano para realizar la extracción quirúrgica incisional de espermatozoides testiculares (TESE) dentro de la hora previa a la punción ovárica de su pareja.

La práctica se realizó bajo sedación y sobre base ambulatoria externando al paciente a las 2 horas del procedimiento.

En todos los casos, la obtención de la muestra testicular se realizó con biopsias abiertas como se muestra en las **Figura 1 (A, B y C)**, donde se aprecia una pequeña herida de 1 a 2 cm que permite seccionar todas las capas escrotales hasta llegar a la túnica albugínea, la que es incidida con bisturí, logrando exponer el tejido testicular por simple compresión.

Las muestras obtenidas se envían al laboratorio de reproducción sumergidas en medio HTF modificado suplementado con albúmina para su procesamiento.

Para extraer los espermatozoides de los túbulos se efectuó una microdissección con agujas estériles bajo visión microscópica en el laboratorio.

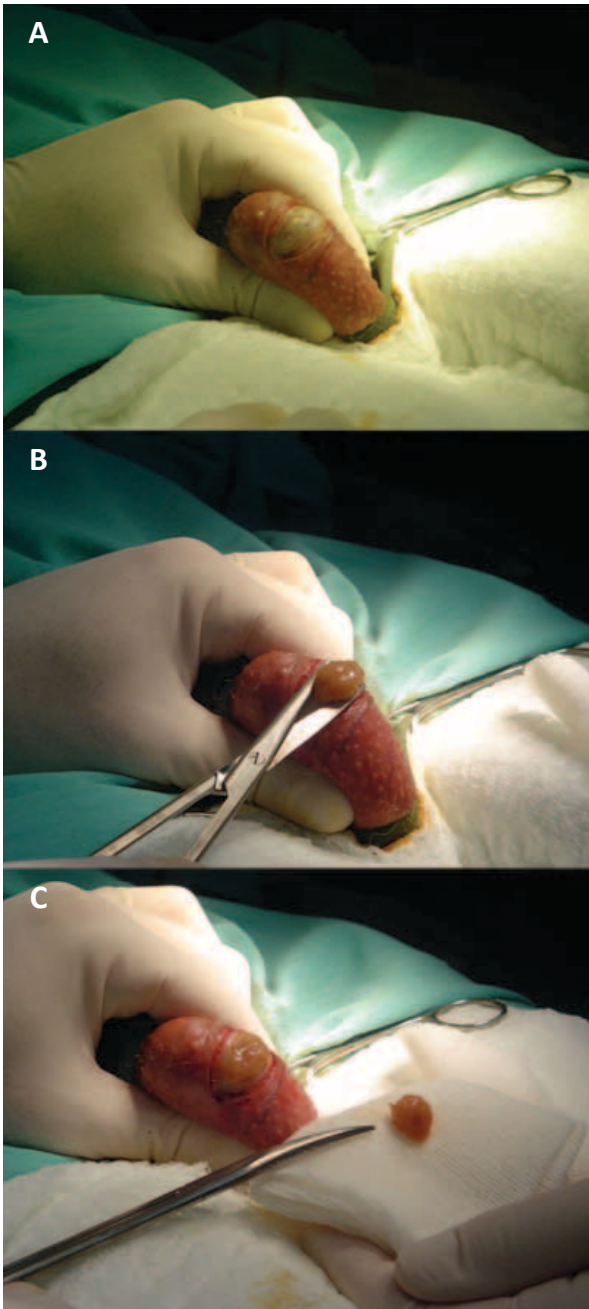


Figura 1. Biopsia Testicular (TESE). **A.** Exteriorización de testículo. **B.** Corte de testículo. **C.** Biopsia de testículo.

Inducción de la ovulación y recuperación ovocitaria

La estimulación ovárica controlada fue realizada en las mujeres utilizando hormona folículo estimulante (FSH-recombinante, Puregon®), gonadotrofina menopáusica humana (hMG, Menopur®), y se inhibió el pico de hormona luteinizante (LH) con un antagonista del factor liberador de gonadotropinas (antagonista-GnRH, Orgalutran®). El monitoreo de la estimu-

lación se realiza mediante control ecográfico y dosaje de estradiol hasta el día previo a la punción. La ovulación fue inducida por una descarga de gonadotrofina coriónica humana (hCG, Gonacor® 5000) cuando, al menos 2 folículos llegaron al tamaño de 18 mm.

La aspiración folicular se realizó por punción transvaginal con control ecográfico 36 horas luego de la administración de la hCG.

Los complejos cúmulus-ovocitos fueron recuperados de los aspirados foliculares en el laboratorio en medio HTFm (modified *Human Tubal Fluid*; Irvine Scientific) suplementado con 0,3 mg/ml de HSA (*Human Serum Albumine*; Irvine Scientific). Los complejos cúmulus-ovocitos fueron cultivados en medio SSM (*Single Step Medium*; Irvine Scientific) suplementado con 10 mg/ml de HSA bajo una atmósfera con 5,5% CO₂ y 37°C. Luego de aproximadamente 3-4 horas, los cúmulus-ovocitos fueron sometidos a una denuclación enzimática de las células del cúmulus y corona mediante la exposición por 30" a hialuronidasa (Irvine Scientific). Los ovocitos desnudos fueron cultivados durante 2 horas en SSM con 10% de HSA recubierto con aceite mineral (*MINERALOIL*, Irvine Scientific) a 37°C con 5,5% CO₂.

Recuperación de los espermatozoides de TESE y posterior ICSI

Las muestras de TESE se evalúan en el laboratorio donde, con ayuda de una cápsula estéril de 60x15mm (Nunclon) y 2 portaobjetos estériles, se disgrega el tejido minuciosamente. Se determina la presencia de espermatozoides y su movilidad en el microscopio invertido (Olympus IX71). Se recolecta esta suspensión con una pipeta Pasteur de vidrio estéril y se coloca en un tubo de centrifuga de 15 ml (Falcon). Los espermatozoides se lavaron con 1 ml HTFm suplementado con 0,3 mg/ml de HSA por centrifugación a 300 rpm durante 10', luego de lo cual el pellet fue recuperado en 0,5 ml del mismo medio.

Los espermatozoides móviles fueron seleccionados para realizar el ICSI. En caso de no encontrarse espermatozoides con movilidad se le agregó a la muestra una metilxantina (pentoxifilina) al 0,5% en buffer, y se dio prioridad a la morfología de la cabeza durante el proceso de selección. Estos espermatozoides fueron colocados en una microgota (5ul) de PVP (*Polyvin-*

ylpyrolidone; Irvine Scientific) ubicada en la placa de ICSI antes de la inyección.

Evaluación embrionaria y transferencia

La fertilización fue observada entre las 18-20 horas posteriores al ICSI. Los cigotos normalmente fertilizados que presentaban dos pronúcleos fueron trasladados a nuevo medio SSM suplementado con 10% HSA y cultivados hasta 72 hs. El clivaje y el desarrollo embrionario fueron controlados periódicamente según Bolton y cols.¹⁸.

La selección de embriones para transferir se realizó el día 3 de acuerdo a parámetros morfológicos. La transferencia embrionaria fue realizada utilizando cáteretes Frydman Ultra Soft con guía ecográfica.

Los embarazos fueron detectados por medición de la subunidad β a los 14-15 días posteriores a la transferencia embrionaria. Los embarazos clínicos fueron determinados por la observación de, al menos, un saco gestacional con latido cardíaco fetal por ecografía entre la 6^o-7^o semana gestacional. La tasa de implantación fue definida como el número de sacos gestacionales dividido el número de embriones transferidos.

Análisis estadísticos

El programa analítico utilizado fue Statistica 7.0. Para comparar las tasas de fertilización entre los grupos TESE y CONTROL se utilizó un test para muestras independientes; para comparar las tasas de embarazo clínico y la calidad embrionaria entre los grupos se utilizó el test chi-cuadrado para variables cualitativas; y para comparar las tasas de implantación de ambos grupos se utilizó el test no paramétrico de KOLMOGOROV-SMIRNOV. La diferencia fue considerada significativa cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se realizó el análisis retrospectivo de 22 parejas con factor masculino severo, grupo TESE, y 58 parejas con factor masculino normal como grupo CONTROL.

La media de las edades en los grupos en estudio, TESE y CONTROL, fueron de $32,95 \pm 4,4$ y $35,4 \pm 4,36$, respectivamente.

La tasa de fertilización observada en pacientes con TESE (65,33%) resultó ser significativamente menor que en pacientes CONTROL (76,38%) ($p=0,034$) (Tabla 1).

En la mayoría de los pacientes de TESE se observaron embriones de buena calidad, en su mayoría G3, sin diferencias significativas entre grupos (embriones G3-4 = TESE: 71,4% y CONTROL: 76%) ($p=0,079$) (Tabla 2, Figura 2).

Puede observarse, además, que en todos los grupos etarios de CONTROL y TESE, entre el 40% y 70% de los embriones producidos son G3, encontrándose por debajo del 35% los embriones G2 (Figura 3).

Los embriones G1 se observan solo en un grupo etario en los casos CONTROL (Figura 3A), y en dos grupos etarios, en los casos TESE (Figura 3B), sin superar el 5% del total producido. La producción de embriones G4 es variable para ambos grupos en estudio; se observan en todos los rangos etarios en el grupo CONTROL (Figura 3A) y en cuatro de los cinco rangos etarios del grupo TESE (Figura 3B).

Las tasas de implantación ($p=0,1$) y embarazo ($p=0,441$) no mostraron diferencia significativa entre ambos grupos (Tabla 1).

	TESE	CONTROL
Número de pacientes	22	58
Tasa de fertilización	65,33% ^a	76,38% ^a
Media de embriones transferidos	2,29	2,02
Tasa de implantación*	12,5%	24,17%
Tasa de embarazo clínico*	28,6%	39,66%
Tasa de embarazo múltiple*	0%	21,74%

Tabla 1. Tasas obtenidas en tratamientos TESE-ICSI (tese) vs. ICSI (control). *Tasas obtenidas por total de transferencias embrionarias. ^aDiferencias significativas entre tratamientos. TESE: extracción de espermatozoides de testículo.

DISCUSIÓN

Este estudio retrospectivo de casos de ICSI en parejas con azoospermia comparado con parejas que presentan factor masculino normal, aporta una percepción de la calidad embrionaria relacionada con las tasas de embarazo e implantación, de manera de observar la influencia de la esterilidad masculina severa en estos aspectos.

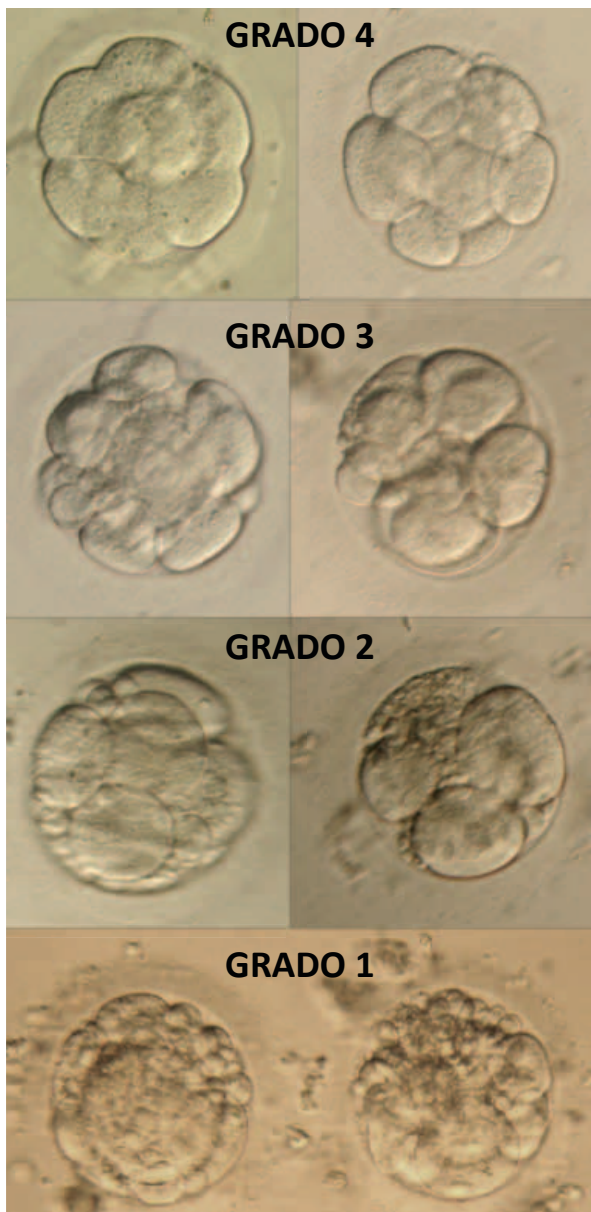


Figura 2. Calidad embrionaria según Bolton y cols. (1989). Grado 4: regular, blastómeras esféricas y simétricas sin fragmentación o hasta 10% fragmentos. Grado 3: regular, blastómeras esféricas con fragmentos hasta 30%. Grado 2: blastómeras irregulares en tamaño y forma con fragmentos hasta 50%. Grado 1: blastómeras poco definidas con más del 50% de fragmentos.

Calidad Embrionaria	Embriones	
	TESE	CONTROL
G1	3	1
G2	17	45
G3	30	103
G4	20	43
Total	70	192

Tabla 2. Calidad embrionaria observada luego de tratamientos TESE-ICSI (tese) e ICSI (control). TESE: extracción de espermatozoides de testículo.

El correcto manejo de la pareja estéril requiere de la coordinación de la recuperación de las gametas de ambas partes⁶. Varios trabajos citan^{5,8,19} que la recuperación de espermatozoides de testículo (TESE) combinado con procedimientos de ICSI resulta en altas tasas de fertilización y embarazo. Los espermatozoides obtenidos de biopsias testiculares presentan mayormente movimiento esporádico y no-progresivo.

En este trabajo, la tasa de fertilización observada en pacientes con TESE resultó ser significativamente menor que en pacientes CONTROL (76,38% vs. 65,33%, respectivamente). Esto pudo ser debido a la baja concentración espermática y a la dificultad de encontrar espermatozoides "normalmente maduros".

Existen pocos reportes que relacionen la calidad embrionaria obtenida con espermatozoides de biopsia testicular^{20,21,22,23}. En este estudio no se observaron diferencias significativas entre las calidades obtenidas en cada grupo (TESE vs. CONTROL), teniendo en cuenta que la cantidad de casos con parejas sin factor masculino severo superó en más de 100% a la cantidad de parejas con TESE. Una correlación positiva se observó entre la calidad embrionaria y los embarazos clínicos obtenidos. La totalidad de los embarazos procedieron de transferencias con, al menos, un embrión de buena calidad, con una media de embriones transferidos cercana a dos.

Las tasas de implantación y embarazo tampoco mostraron diferencia significativa entre ambos grupos. Esta última se mantuvo dentro del rango ya reportado en otros trabajos.

CONCLUSIÓN

Podemos concluir que si bien la tasa de fertilización de los pacientes con TESE-ICSI es menor, una vez lograda la implantación, la tasa de embarazo no presenta diferencia alguna con pacientes de ICSI realizado con espermatozoides eyaculados. Se infiere de ello que la técnica de TESE-ICSI es un método válido y eficaz para conseguir embarazo.

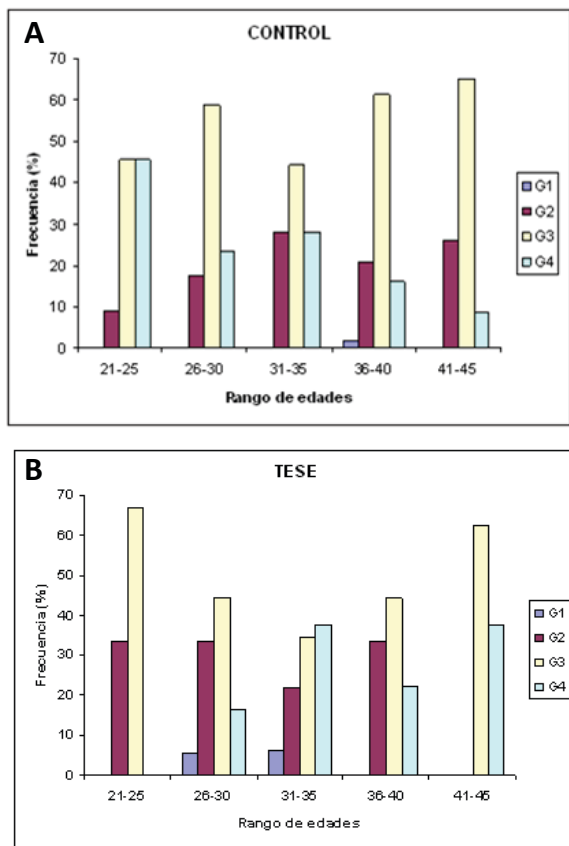


Figura 3. Calidad embrionaria según grupos etarios en grupo control (A) y grupo TESE (B). Se observa la frecuencia (%) de distribución de cada clase embrionaria en rangos de edades de 4 años en el total de la población en estudio en cada caso.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro sincero agradecimiento al Dr. Marcelo Pájaro, Investigador del INIDEP responsable de la área de pesquería de peces pelágicos, por su colaboración con el análisis estadístico de los datos en este trabajo.

MENCIÓN ESPECIAL

Al Doctor Miguel Correa, que aportó pacientes para este estudio, y siempre promovió la investigación en nuestro equipo de trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Desai N, AbdelHafez F, Sabanegh E and Golderfarb J. Paternal effect on genomic activation, clinical pregnancy and live birth rate after

ICSI with cryopreserved epididymal versus testicular spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009. 3 (7):142.

- Chandley, A.C. The chromosomal basis of human infertility. *Br Med Bull.* 1979. 35:181-186.
- Valzacchi G, Layus O, Martinez P, Lambertini R, Liyo J, Ocantos J, Giúdice CA. and Damia O. Obstrucción de conductos eyaculadores. *Rev. Arg. De Urol.* 2008. 73(3):138-143.
- Correa Y, Ortiz Nuñez GA, Hernandez Marin I, Tovar JM and Ayala Ruiz A. Detención de la espermatogénesis. *Ginecol Obstret Mex.* 2005. 73:500-508.
- Wood S, Thomas K, Schnauffer K, Troup S, Kingsland C and Lewis-Jones I. Reproductive potential of fresh and cryopreserved epididymal and testicular spermatozoa in consecutive intracytoplasmic sperm injection cycles in the same patients. *Fertil Steril.* 2002. 77: 1162-1166.
- Windt M, Coetzee K, Kruger T, Menkveld R and Van der Merwe, J. Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in men with azoospermia. *J Assist Reprod Genet.* 2002.19(2):53-59.
- Cooperberg MR, Chi T, Jad A, Cha I and Turek PJ. Variability in testis biopsy interpretation: implications for male infertility care in the era of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2005. 84:672-677.
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H and Devroy P. High fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicular biopsy. *Hum Reprod.* 1995. 10:148-152.
- Habermann H, Seo R, Cieslak J, Niederberger C, Prins GS and Ross L. In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen testicular spermatozoa. *Fertil Steril.* 2000. 73:955-960.
- Weissman A, Horowitz E, Ravhon A, Nahum H, Golam A and Levran D. Pregnancies and live births following ICSI with testicular spermatozoa after repeated implantation failure

- using ejaculated spermatozoa. *Reprod. Biomed.* 2008. 17(5):605-609.
11. Zhang Q.F, Qiao J, Bai Q, Li M, Lian Y, Wu YQ and Liu P. Outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycle: fresh compared to cryopreserved-thawed testicular and epididymal spermatozoa. *Zhonghua Fu Chan KeZaZhi.* 2009. 44(10):740-744.
 12. Podsiadly B, Woolcott R, Stanger J and Stevenson K. Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of cryopreserved spermatozoa recovered from testicular biopsy. *Hum Reprod.* 1996. 11 (6):1306-1308.
 13. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H and Devroey P. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum. Reprod.* 1995. 10(1):148-152.
 14. Tesarik J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed.* 2005. 10(3):370-375.
 15. Palermo GD, Colombero LT and Rosenwaks Z. The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Rev Reprod.* 1997. 2:19-27.
 16. Terada Y. Functional analyses of the sperm centrosome in human reproduction: implications for assisted reproductive technique. *Soc Reprod Fertil.* 2007. 63(Suppl):507-513.
 17. Sathananthan AH. Functional competence of abnormal spermatozoa. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1994. 8:141-156.
 18. Bolton V, Hawes S, Taylor C and Parsons J. Development of spare human pre implantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1989. 6(1):30-35.
 19. Croo I, Van der Elst J, Everaert K, De Sutter P and Dhont M. Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 2000. 15(6):1383-1388.
 20. Friendler S, Raziel A, Soffer Y, Strassburger D, Komarovskiy D and Ron-El R. Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with non-obstructive azoospermia – A comparative study. *Fertil Steril.* 1997. 68:892-897.
 21. Prins GS, Dolgina R, Studney P, Kaplan B, Ross L and Niederberger C. Quality of cryopreserved testicular sperm in patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *J Urol.* 1999. 161:1504-1508.
 22. Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Schachter M, Soffer Y and Ron-El R. Factors influencing the outcome of ICSI in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia: A comparative study. *Hum Reprod.* 2002. 17:3114-3121.
 23. Sousa M, Cremades N, Silva J, Oliveira C, Ferraz L, Teixeira da Silva J, Viana P and Barros A. Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcomes after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. *Hum Reprod.* 2002. 17:1800-1810.