

Nuestros resultados en ICSI con espermatozoides congelados y frescos obtenidos por TESE

Sergio Fumero Arteaga^a, Vanessa Figueroa Sosa^a, Delia Báez Quintana^b, Raquel Blanes Zamora^b, Rebeca Vaca Sánchez^b, Jose Carlos Alberto Bethencourt^b, Pedro Rodríguez Hernández^a y Pedro Ramón Gutiérrez Hernández^a

^aServicio de Urología. Unidad de Andrología. Hospital Universitario de Canarias. La Laguna. Santa Cruz de Tenerife. España.

^bServicio de Ginecología y Obstetricia. Unidad de Reproducción Humana. Hospital Universitario de Canarias. La Laguna. Santa Cruz de Tenerife. España.

RESUMEN

Introducción: En la actualidad, la realización de ICSI con espermatozoides procedentes del testículo obtenidos mediante TESE (Testicular Sperm Extraction) es un medio altamente eficaz y con excelentes resultados en tratamientos de fertilidad cuando el factor masculino es severo. Aquí presentamos los resultados de ICSI con espermatozoides frescos y congelados obtenidos mediante TESE en nuestro centro.

Material y método: Se analizaron los resultados revisando retrospectivamente, desde 2002 a 2004, un total de 135 TESE-ICSI, de las cuales 80 (59,3%) fueron a partir de espermatozoides frescos y 55 (40,7%), de espermatozoides congelados. Se determina movilidad (porcentaje grado ++/+++), tasa de fertilización, media de embriones transferidos, tasa de gestación y tasa de aborto comparando las realizadas con espermatozoides frescos y congelados.

Resultados: De las muestras frescas, 62 (77,5%) presentaban movilidad ++/+++ frente a 16 (29%) de las muestras congeladas. En relación con la tasa de fertilización, se obtuvo un 56,4% en muestras frescas, frente al 46,5% de las congeladas. El número medio de embriones transferidos fue de 2,5, y se consiguió una tasa de gestación del 16,25% en frescas y del 16,36% en congeladas. Sólo 1 (7,6%) de las pacientes del grupo de espermatozoides frescos sufrió aborto, frente a 3 (33,3%) en el grupo de congelados.

Conclusiones: Los espermatozoides no sometidos a congelación presentan un mayor porcentaje de movilidad. Las tasas de fertilización, gestación y aborto no presentan diferencias significativas entre ambos grupos. Estos datos deben ser tenidos en cuenta en nuestro medio a la hora de informar a los pacientes sobre el resultado de la técnica TESE-ICSI.

Palabras clave: TESE. ICSI. Espermatozoides frescos. Espermatozoides congelados.

ABSTRACT

Our results in ICSI with frozen versus fresh sperm obtained by TESE

Introduction: At the present time, the accomplishment of ICSI with testicular sperm obtained by TESE (Testicular Sperm Extraction) is a highly effective way and with excellent results in fertility treatments when the masculine factor is severe. In this article we display the results of ICSI with fresh and frozen-thawed sperm obtained by TESE in our center.

Materials and method: We review retrospectively from year 2002 to 2004 a total of 135 TESE-ICSI of which 80 (59.3%) was realized with fresh sperm and 55 (40.7%) with frozen sperm. We determine mobility (degree ++/+++), fertilization rate, average of transferred embryos, pregnancy rate and abortion rate comparing both groups. **Results:** In the fresh sperm group 62 (77.5%) had mobility ++/+++ nevertheless in the frozen-thawed group only 16 (29%) had that mobility. The fertilization rate was 56.4% in fresh and 46.5% in frozen sperm group. The average number of transferred embryos was of 2.5, with a pregnancy rate of 16.25% vs 16.36% in fresh versus frozen sperm group, respectively. Only there was one abortion (7.6%) in the fresh sperm group versus 3 (33.3%) in the frozen-thawed group.

Conclusions: The fresh sperms have a greater mobility rate. There was no statistically significant difference between the two groups in fertilization, pregnancy and abortion rate. This information must be considered in our way when we inform the pairs about the result of the TESE-ICSI.

Key words: TESE. ICSI. Fresh sperm. Frozen-thawed sperm.

Correspondencia: Sergio Fumero Arteaga.
Servicio de Urología. Unidad de Andrología. Hospital Universitario de Canarias.
Ofra, s/n. 38320 La Laguna. Santa Cruz de Tenerife. España.
Correo electrónico: sergiofumero@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La extracción testicular de espermatozoides (TESE, del inglés TEsticular Sperm Extraction), en combinación con la inyección intracitoplásmica (ICSI, del inglés Intra-Cytoplasmic Sperm Injection) de los espermatozoides, es un método efectivo (entendiéndose por tal una tasa de embarazo del 30-40% por ciclo) para el tratamiento de las azoospermias obstructivas y no obstructivas que conserven algún grado de espermatogénesis¹⁻⁶. De forma resumida, podríamos recordar que la TESE está indicada en todas las azoospermias obstructivas (agenesia deferencial, obstrucción de conductos eyaculadores, vasectomizados, azoospermia tras herniorrafia, fracaso de epididimovasostomía o vasovasostomía, etc.) y no obstructivas (azoospermia por bloqueo parcial en la espermatogénesis, etc.), necrozoospermias, alteraciones de la eyaculación y, en algunas ocasiones, oligoastenozoospermia muy severas, criptozoospermia, cuando ambas se alternan con azoospermia^{7,8}.

La referida TESE se puede realizar intraciclo, es decir coincidiendo con el día de la punción de los ovocitos en la pareja, y es lo que denominamos TESE-ICSI con espermatozoides frescos. Sin embargo, en otras ocasiones, de lo que disponemos es tejido testicular criopreservado, que se utiliza el día de dicha punción, y es lo que denominamos TESE-ICSI con espermatozoides congelados.

El empleo de espermatozoides, para ICSI, desde TESE en fresco o desde TESE congelada ha suscitado cierto debate sobre la eficacia, en cuanto a porcentajes de fertilización y embarazo, aunque muchas investigaciones arrojan resultados similares entre ambas técnicas^{1,9-15}.

El objetivo de este estudio es reflejar los resultados de esta técnica, en cuanto a movilidad, tasa de fertilización, tasa de gestación y tasa de aborto se refiere, en nuestro medio y comprobar si existen diferencias significativas entre usar espermatozoides frescos y usar congelados en la técnica TESE-ICSI.

MATERIAL Y MÉTODO

En el presente trabajo, se han analizado los resultados obtenidos durante el período comprendido entre 2002 y 2004 (3 años). Todos los pacientes a los que se realizó la TESE fueron previamente citados en la consulta de andrología, al menos en 2 ocasiones, donde se les realizó una completa historia clínica, que incluía antecedentes familiares y personales, historia sexual y existencia de factores tóxicos. Al mismo tiempo, fueron sometidos a examen físico general y geni-

tal, valorando especialmente el tamaño y la morfología testicular. Entre las pruebas complementarias, se solicitó un perfil hormonal completo (FSH, LH, prolactina, testosterona y estradiol) y estudio seminal, consistente como mínimo en 2 seminogramas con un intervalo de 15-60 días y al menos uno de ellos con técnica Recuperación de Espermatozoides Móviles (REM). Lógicamente, se descartó las eventuales infecciones asociadas mediante cultivo seminal, detección de *Chlamydia trachomatis* en uretra, serología de hepatitis, sífilis y VIH. A todos los sujetos se les realizó estudio de cariotípico y de la zona AZF, excepto a los varones vasectomizados.

Durante el mencionado período de 3 años, se realizó un total de 148 TESE, y en 135 de ellas se realizó la transferencia de embriones. De estas 135 ICSI con *transfer*, 80 (59,3%) fueron realizadas usando espermatozoides frescos y las 55 restantes (40,7%), con espermatozoides congelados (fig. 1).

Preparación de los espermatozoides

La TESE se realizó en el quirófano de la unidad de reproducción humana (URH) de nuestro centro, en régimen ambulatorio y con anestesia local. Se cumplió con todos los procedimientos requeridos en estos casos: consentimiento informado, valoración analítica general y monitorización de las constantes del paciente antes de la administración del anestésico mediante inyección cordonal de mepivacaína al 1%. Pasados unos 5 min, se procedió a incisión cutánea de aproximadamente 1 cm en el rafe medio escrotal y se accedió al testículo a través de la túnica vaginal. Posteriormente, se realizaron una o más incisiones en la albugínea de unos 0,3-0,5 cm en el polo superior del testículo en aparentes mejores condiciones, para obtener pulpa testicular tras extrusión. Dicho tejido se colocó en un medio de lavado (Medicult, Dinamarca) y

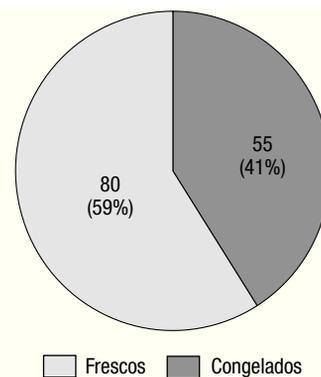


Figura 1. Número de TESE-ICSI con espermatozoides frescos y congelados.

fue disecado con la ayuda de 2 escalpelos estériles. El líquido contenido en la placa fue aspirado usando una pipeta automática y se procedió a su incubación a 37 °C al 5% de CO₂. Justo antes del proceso de microinyección, el contenedor del líquido fue centrifugado a 600 g durante 5 min¹⁶.

Criopreservación, descongelado y preparación de espermatozoides¹⁶

Antes del congelado, 1 ml del medio crioprotector Test Yolk buffer, que contiene glicerol (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), fue añadido a 2 ml de suspensión espermática a temperatura ambiente. La mezcla fue homogeneizada y colocada en un baño a 4 °C durante 45 min. Posteriormente la mezcla fue nuevamente homogeneizada y colocada con la ayuda de una pipeta automática en gotas de 100 µl sobre una superficie de hielo seco (Nagase, 1964). El congelado de las gotas se produce en aproximadamente 1 min. Las gotas congeladas (pastillas) fueron sumergidas en nitrógeno líquido (-196 °C) y almacenadas en viales criotubo de 1 o 2 ml (Lab-Tek, Nalge Nunc International).

Para la descongelación, las pastillas fueron sacadas del nitrógeno líquido y colocadas en un tubo de Falcon de 5 ml (Beckton and Dickinson, Lincoln Park, NJ) durante 5 min a temperatura ambiente. El tubo con las pastillas fue colocado entonces a 37 °C en una cámara al 5% de CO₂ durante 15 min. Para eliminar el medio de criopreservación, las muestras fueron lavadas mediante centrifugación con 2 ml de medio IVF (Medicult, Copenhagen, Dinamarca) a 600 g durante 5 min. Una vez que el sobrenadante fue eliminado, el sedimento (*pellet*) fue resuspendido en 100 µl de medio IVF. Esta suspensión final fue incubada a 37 °C y 5% de CO₂ durante 1 h. A partir de entonces, la presencia de espermatozoides morfológicamente normales para ICSI fue comprobado bajo un microscopio invertido con una magnificación ×100 (Diaphot; Nikon Corporation, Tokio, Japan). En algunos casos, encontramos únicamente espermatozoides inmóviles morfológicamente normales.

Estimulación ovárica y obtención de ovocitos¹⁶

La supresión hipofisaria se consiguió usando un protocolo largo con un análogo de la GnRH (Decapeptyl; Ipsen, Barcelona, España), seguido de estimulación con FSH recombinante (Gonal; Serono Laboratories, Madrid, España). La punción folicular transvaginal ecodirigida se llevó a cabo a las 36-38 h tras la inyección de HCG. Las células del cumulus-corona fueron inicialmente retiradas mediante un medio de lavado (Medicult, Copenhagen, Dinamarca) y 80 UI/ml de hialurodinasa (Hialurodinasa tipoIV-S, St Louis, MO) durante 1 min. Tras retirar las células de la corona, sólo los ovocitos en metafase II fueron inyectados.

Análisis estadístico

Los test estadísticos fueron llevados a cabo mediante la prueba de la χ^2 para enfrentar las tasas de fertilización, gestación y aborto al origen de los espermatozoides (muestra fresca o criopreservada). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si $p < 0,05$.

RESULTADOS

De las 148 TESE realizadas, se realizó transferencia embrionaria en 135 (91,2%); de las que no se pudo transferir, fue por fallos de fertilización en 12 casos (6 en frescos y 6 en congelados) y porque no se obtuvo ovocitos en 1 caso (fresco). En la tabla 1 se reflejan todos los datos obtenidos en los años analizados, así como los resultados totales, y en la figura 2 se muestra la representación gráfica. De las 135 TESE-ICSI con transferencia embrionaria realizadas, como dijimos anteriormente, 80 (59,3%) fueron con espermatozoides frescos, frente a 55 (40,7%) que se hizo con espermatozoides congelados (fig. 1). Del total de las muestras frescas, 62 (77,5%) presentaban una movilidad espermática de ++/++, frente a 16 (29%) de las que fueron criopreservadas (fig. 3). Estas diferencias

TABLA 1. Datos globales de las TESE-ICSI con transferencia embrionaria

	TESE, n			Móviles, % (n)		Fertilización, %		Embriones transferidos, n		Gestación, % (n)		Aborto, % (n)*	
	Fresco	Congelado	Total	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado
2002	19	21	40	89,4 (17)	28,5 (6)	59,8	48,4	2,7	2,8	10 (2)	28,5 (6)	0	50 (3)
2003	29	24	53	86,2 (25)	29,1 (7)	59	45	2,5	2,4	10,3 (3)	0 (0)	33,3 (1)	0 (0)
2004	32	10	42	62,5 (20)	30 (3)	50,5	46,3	2,3	2,4	25 (8)	30 (3)	0	0
Total	80	55	135	77,5 (62)	29,09 (16)	56,4	46,5	2,5	2,53	16,25 (13)	16,36 (9)	7,69 (1)	33,33 (3)

*De los que consiguieron gestación.

en la movilidad fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$). La tasa media de fertilización en el grupo de espermatozoides frescos fue de un 56,4% (el 59,8, el 59 y el 50,5 en 2002, 2003 y 2004 respectivamente) y en el grupo de congeladas fue del 46,5% (el 48,4, el 45 y el 46,3 en 2002, 2003 y 2004 respectivamente) (fig. 4). El número medio de embriones transferidos fue de 2,5 en ambos grupos. Al hablar de tasas de gestación, los resultados obtenidos fueron el 16,25% (13/80) del grupo de espermatozoides frescos y del 16,36% (9/55) del de muestras congeladas. Uno de los embarazos en las mujeres inseminadas con espermatozoides frescos fue gemelar (año 2002). Sólo una de las pacientes en las que se consiguió embarazo con espermatozoides frescos sufrió aborto (el 7,69% de las gestantes; 1/13). En el grupo de embarazadas con espermatozoides congelados 3 pacientes abortaron (el 33,3% de las gestantes en este grupo; 3/9), aunque de aborto propiamente dicho solo hubo 1 caso, ya que en los otros 2 se trató de emba-

razos ectópicos, aunque se los haya incluido como abortos (fig. 5). Las diferencias obtenidas en los parámetros fertilización, gestación y aborto entre ambos grupos son independientes de que haya o no habido congelación, es decir no se encontró significación estadística. Sin embargo, en lo concerniente a la tasa de abortos, sería necesario aumentar el tamaño de la muestra y su comparación con otros grupos para considerar fiable dicha independencia en nuestro medio.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La mayoría de la parejas que deseen tener hijos en las que el varón presente azoospermia y posea esperma-

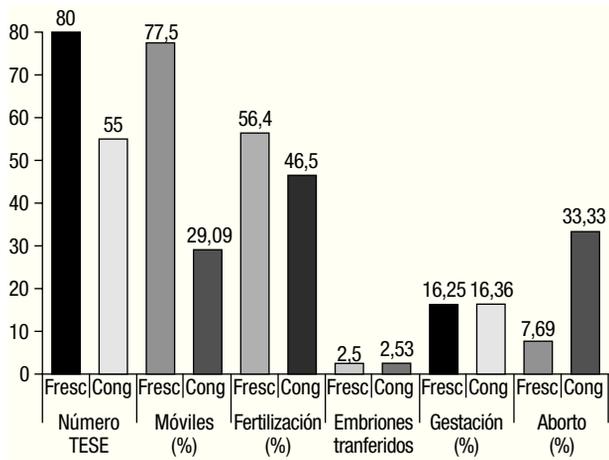


Figura 2. Representación gráfica de los resultados generales. Fresc: fresco; cong: congelado.

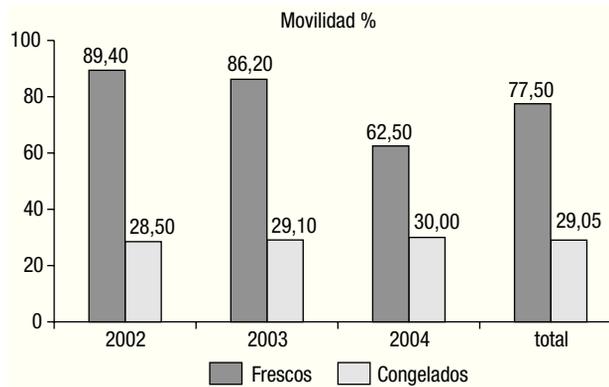


Figura 3. Tasa de movilidad por año y total.

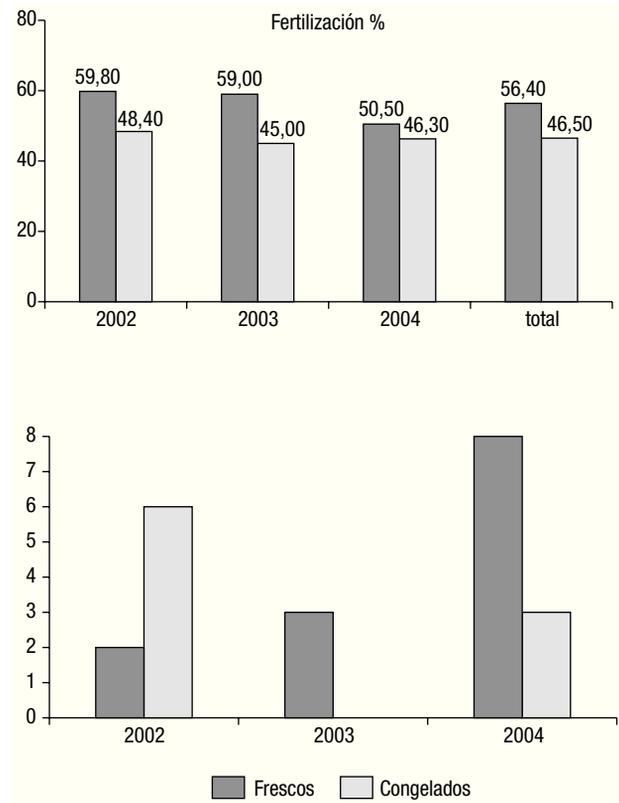


Figura 4. Tasa de fertilidad por año y total.

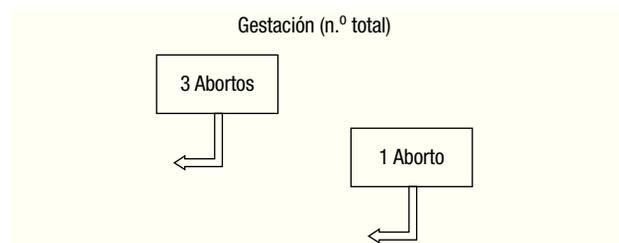


Figura 5. Número de gestaciones y abortos por año.

tozoides viables en el testículo pueden ser tratadas con TESE e ICSI. No obstante y en muchas ocasiones, dicha técnica no puede ser realizada con espermatozoides frescos, ya que o no se conoce si realmente el paciente posee espermatozoides viables en su testículo (en las biopsias que sean diagnósticas) o no se encuentra una cantidad adecuada o de suficiente calidad para que se pueda usarlos en fresco. No obstante, muchas parejas son reacias a la donación de ovocitos o el uso de semen de donante en el caso de que, tras haber estimulado hormonalmente a la mujer, no se obtenga espermatozoides. Razón por la cual, en casos de “riesgo”, se demanda una “prueba” en forma de biopsia diagnóstica, tanto para estudio anatomopatológico como para criopreservación de espermatozoides. Una criopreservación exitosa permite a las parejas tomar una decisión más tranquila y con la seguridad de saber que disponen de una nueva oportunidad para la obtención de espermatozoides. Asimismo evitamos, en muchas ocasiones, la repetición de biopsias testiculares y los efectos colaterales que éstas conllevan.

En nuestro estudio, y como cabría esperar, observamos que existe una diferencia significativa en la movilidad de los espermatozoides, según se trate de espermatozoides frescos o congelados, a favor de los primeros. Sin embargo, tal y como observamos en las tasas de fertilización y gestación, esta diferencia en la movilidad no se refleja posteriormente en los resultados finales, es decir, las diferencias observadas no tienen significación estadística. Ello indica que, a no ser que el número de espermatozoides móviles obtenidos en la biopsia testicular sea limitante, estas diferencias no van a impactar en los resultados de los ciclos de TESE/ICSI con espermatozoides testiculares congelados. Esto es un dato que consideramos importante, ya que informando y aconsejando a las parejas en tratamiento de fertilidad, según dichos resultados, éstas tendrán más facilidad a la hora de tomar una decisión y de no sentirse “presionados” a donar ovocitos o aceptar semen de donante por miedo a que los espermatozoides congelados sean de peor calidad o de obtener con éstos peores resultados.

Tomando los valores referidos a los abortos, vemos que de forma global éstos son más frecuentes con la utilización de espermatozoides congelados; sin embargo, cuando se realizó el análisis estadístico se evidenció que dicha diferencia no era significativa, aunque se precisaría de un mayor tamaño muestral para asegurar, con el grado de significación establecido, la independencia de las variables fresco/congelado con aborto. En cuanto a la mayor frecuencia de abortos en el grupo de espermatozoides congelados, cabría comentar que hay estudios en que se demuestra que

la incubación de espermatozoides testiculares tras su descongelación resulta en un aumento en el nivel de fragmentación de ADN directamente proporcional al tiempo y la temperatura de incubación¹⁷. Esta susceptibilidad de los espermatozoides testiculares estaría relacionada con el hecho de que la cromatina de espermatozoides testiculares todavía no está compactada con puentes disulfuro y, por lo tanto, es más vulnerable al daño de ADN. Esto podría explicar, al menos en parte, la mayor tasa de aborto observada en el grupo en que se utilizó espermatozoides congelados. Respecto a esto también hay que comentar que se incluyó como abortos 2 embarazos ectópicos obtenidos en el primer año del período analizado, casos que probablemente se debieran a defectos técnicos.

Estos resultados nos sirven para evidenciar que en nuestro medio no existen prácticamente diferencias en la utilización de espermatozoides frescos o congelados ya que, como hemos expuesto, las tasas de éxito mediante una u otra técnica son similares. Aunque la motilidad espermática está claramente volcada a favor de las muestras frescas, esto no se refleja en los datos finales de gestación que, realmente, son los que interesan a la hora de valorar la eficacia de una u otra técnica. Aún faltan datos para demostrar si la congelación predispone o no a un mayor número de abortos, aunque esperaremos a ulteriores análisis para validar los resultados.

Bibliografía

1. Park YS, Lee SH, Song SJ, Jun JH, Koong MK, Seo JT. Influence of motility on the outcome of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection with fresh vs. frozen testicular sperm from men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2003;80:526-30.
2. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal-Bertin G, van de Casseye M. Successful fertilization by testicular spermatozoa in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod.* 1993;8:1339-40.
3. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1994;62:639-41.
4. Craft I, Tsirigotis M. Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 1995; 10:1623-6.
5. Nagy Z, Liu J, Cecile J, Silber S, Devroey P, Van Steirteghem A. Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1995;63:808-15.
6. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod.* 1995;10:148-52.
7. Teppa-Garran AD, Palacios-Torres A. Evaluación actual de la infertilidad masculina. *Invest Clin.* 2004;45:355-70.
8. Galmés Belmonte I. Utilidad y necesidad del andrólogo en las unidades de reproducción asistida. *Actas Urol Esp.* 2004;28: 364-76.
9. Friedler S, Raziell A, Soffer Y, Strassburger D, Komarovskiy D, Ron-el R. Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia — a comparative study. *Fertil Steril.* 1997;68: 892-7.

10. Windt ML, Coetzee K, Kruger TF, Menkveld R, Van der Merwe JP. Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in men with azoospermia. *J Assist Reprod Genet.* 2002;19:53-9.
11. Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Ruiz A, Remohi J, Pellicer A. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;169:15-9.
12. Habermann H, Seo R, Cieslak J, Niederberger C, Prins GS, Ross L. In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Fertil Steril.* 2000;73:955-60.
13. Madgar I, Hourvitz A, Levron J, Seidman DS, Shulman A, Raviv GG, et al. Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm extracted from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 1998;69:1080-4.
14. Friedler S, Raziel A, Soffer Y, Strassburger D, Komarovsky D, Ron-El R. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved epididymal comparative study. *Hum Reprod.* 1998;13:1872-7.
15. Van Steirteghem A, Nagy P, Joris H, Janssenswillen C, Staessen C, Verheyen G, et al. Results of intracytoplasmic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998;13 Suppl 1:134-42.
16. De Oliveira NM, Vaca Sanchez R, Rodriguez Fiesta S, Lopez Salgado T, Rodríguez R, Bethencourt JC, et al. Pregnancy with frozen-thawed and fresh testicular biopsy after motile and immotile sperm microinjection, using the mechanical touch technique to assess viability. *Hum Reprod.* 2004;19:262-5.
17. Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SE. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil Steril.* 2004;82:1443-5.