

EMBARAZO LOGRADO POR INYECCION INTRACITOPLASMATICA DE OVOCITOS CON ESPERMATOZOIDES PROVENIENTES DE UNA BIOPSIA DE TESTICULO CRIOPRESERVADA

CARLOS J. QUINTANS, GASTON REY VALZACCHI, MONICA J. DONALDSON, LILIANA A. BLANCO, R. SERGIO PASQUALINI

Halitus Instituto Médico, Buenos Aires

Resumen Se describe un embarazo logrado en una paciente de 26 años mediante fertilización *in vitro* por inyección intracitoplasmática de espermatozoides obtenidos de una biopsia testicular criopreservada. Este procedimiento se utilizó debido a que el esposo presentaba una azoospermia obstructiva. En un primer intento se obtuvo un embarazo utilizando biopsia fresca y el resto del tejido se criopreservó. Al interrumpirse espontáneamente el embarazo se realizó un segundo intento con la muestra criopreservada. Se obtuvieron 12 ovocitos metafase 2, los que inyectados dieron 9 embriones. Tres de ellos se transfirieron en estadio de 8 células, los seis restantes se criopreservaron. Se logró un embarazo clínico con dos sacos gestacionales.

Palabras clave: azoospermia obstructiva, biopsia de testículo, ICSI, infertilidad masculina, criopreservación de espermatozoides, embarazo

A partir de la introducción de la ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*)¹ cambiaron completamente las posibilidades de tratamiento para la infertilidad debida a factor masculino severo. Así es que las azoospermias de origen congénito o adquirido pasaron a ser tratables con buenas posibilidades de éxito mediante la combinación de la ICSI con la micro aspiración de espermatozoides del epidídimo (MESA), extracción de espermatozoides de biopsias testiculares (TESE) o biopsia testicular mediante aguja fina; todas las cuales resultaron exitosas en cuanto a la obtención de buenas tasas de fertilización, y embarazos evolutivos²⁻⁵. También se comunicaron resultados comparativamente buenos luego de realizar ICSI con muestras de espermatozoides obtenidos de aspiración de epidídimo y posteriormente mantenidos criopreservados, indicando

que a pesar del efecto negativo de la criopreservación sobre la viabilidad de los espermatozoides, se podía recuperar un número suficiente para realizar una ICSI con buenos resultados⁶. Dado que la técnica requiere sólo unos pocos espermatozoides viables, la criopreservación de parte de la muestra obtenida se recomienda para evitar la repetición de la cirugía en caso de requerirse realizar un nuevo ciclo de ICSI. La criopreservación de muestras de testículo también debe realizarse en base a las mismas consideraciones, si bien en un principio no se la tomaba como una alternativa válida debido al escaso número de espermatozoides presentes y a su escasa motilidad^{3,4}. Sin embargo fueron surgiendo evidencias de que la criopreservación de muestras de testículo podía ser de utilidad para la realización de ciclos de ICSI sin necesidad de recurrir a la obtención de nuevas muestras^{7,8}.

En este artículo se describe un caso en el cual ante la necesidad de repetir un ciclo de ICSI en una azoospermia obstructiva, se recurrió a un fragmento de testículo que se mantenía criopre-

Recibido: 24-IX-1997

Aceptado: 26-XI-1997

Dirección postal: Dr. Carlos José Quintans, Halitus Instituto Médico, Marcelo T. Alvear 2086, 1122 Buenos Aires, Argentina

servado desde un intento previo, y se obtuvo así un embarazo clínico.

Descripción del caso

Una pareja, ambos de 26 años, consultó por esterilidad primaria en marzo de 1996. La mujer no presentaba ninguna anomalía luego de un análisis exhaustivo, mientras que en el esposo se encontró una azoospermia de origen obstructivo por una agenesia distal de vías espermáticas. Considerando la posible asociación entre esta patología y la fibrosis quística, se evaluó a ambos miembros de la pareja para las 22 mutaciones más frecuentes del gen del CFRT (Canal de Cl⁻) siendo negativo el estudio de todas ellas. Por ser este un cuadro obstructivo no factible de resolver con microcirugía se decidió efectuar un ciclo de fertilización in vitro (FIV) mediante ICSI (Inyección intracitoplasmática del espermatozoide). En octubre de 1996 se realizó la estimulación ovárica mediante el análogo de hormona liberadora de gonadotropinas (GNRH-a) Acetato de Leuprolida (Luprón, Laboratorios Abbott, Argentina), hormona foliculo estimulante pura (FSH-P, Metrodín HP, Serono, Argentina) y gonadotropina menopáusica humana (HMG, Pergonal, Serono, Argentina). Cuando la medida de los folículos dominantes fue igual o mayor a 18 mm se inyectó 10.000 U.I. de gonadotropina coriónica humana (HCG, Profasi, Serono, Argentina) y 36 horas después se efectuó la punción por vía transvaginal, bajo control ecográfico utilizando anestesia local paracervical y parauterina mediante clorhidrato de lidocaína. De los 13 ovocitos recolectados, 12 resultaron maduros (metafase 2) y 1 inmaduro (Profase 1). El día de la punción se intentó sin éxito la recuperación de espermatozoides por punción de epidídimo bajo anestesia local. Debido a ello se realizó una toma de biopsia de tejido testicular. La muestra fue procesada procediendo a lavarla de restos de sangre con medio HTF (Human Tubal Fluid)⁹, suplementado con 10% de SSS (Syntetic serum substitute, Irvine Scientific, Santa Ana, California, U.S.A.), y luego reducida a muy pequeños trozos con la ayuda de tijeras. Una alícuota se reservó para el procedimiento y el resto se mezcló con un volumen igual de HTF con 10% de SSS y 12% de glicerol, se envasó en criotubos de 1 ml y se criopreservó equilibrando la temperatura durante 30 minutos a 4°C, luego manteniendo otros 30 minutos suspendido en el cuello de un termo sobre vapor de nitrógeno líquido, y finalmente sumergiendo las muestras en nitrógeno líquido donde fueron mantenidas hasta su utilización. Con el resto de la muestra fresca se efectuó una ICSI utilizándose una técnica semejante a la ya descrita¹⁰. Los 12 ovocitos

metafase 2 fueron inyectados, uno se destruyó durante el procedimiento, y de los 11 restantes 8 mostraron señales de fertilización (presencia de 2 pronúcleos) 14 horas luego de la ICSI. Aproximadamente 48 horas posteriores a la aspiración se transfirieron 3 preembriones de cuatro células, con blastómeras simétricas y escasos fragmentos. Se utilizó para ello un catéter de Frydman y la vía transcervical. Los embriones no transferidos presentaban más del 25% de fragmentos citoplasmáticos anucleados, y se pasaron a cocultivo sobre una monocapa de células vero con medio alfa-MEM (modificación α , minimal essential medium) suplementado con glutamina y 10% de SSS. Esto tuvo por objetivo permitir una mejor evaluación de su potencial evolutivo, y evitar así criopreservar material inviable, ya que la presencia de elevada fragmentación indica menor viabilidad tanto antes como después de la criopreservación. Luego de 72 horas dos embriones que continuaron desarrollando alcanzaron el estadio de blastocisto expandido, y fueron criopreservados según la técnica de Menezes¹¹, los tres restantes mostraban polifragmentación y detención del desarrollo en estadios de 4 a 5 células. En este ciclo se obtuvo un embarazo trigemelar biamniótico, que se interrumpió espontáneamente a las 22 semanas. Cuatro meses después se realizó la transferencia de los blastocistos criopreservados, sin obtener embarazo, por lo que se realizó un nuevo ciclo de estimulación ovárica utilizando el mismo protocolo. En esta ocasión se capturaron 15 ovocitos, de los cuales 12 estaban en metafase 2. La muestra de testículo criopreservada se descongeló unas 14 horas antes de la punción, fundiendo el hielo en baño de María a 37°C, y diluyendo con alfa-MEM con 10% de SSS. El sedimento se resuspendió en 0,5 ml del mismo medio de cultivo y se colocó en incubadora a 37°C y con atmósfera de 5% de CO₂. Al día siguiente se realizó la observación microscópica en fresco, encontrándose espermatozoides de buena morfología con movilidad in situ. Utilizando estos espermatozoides se realizó ICSI en los 12 ovocitos maduros de los cuales 9 fertilizaron normalmente. A las 72 horas de la punción se realizó la transferencia, del mismo modo que en el primer ciclo. Se transfirieron tres preembriones, dos de 8 células con blastómeras simétricas, sin fragmentos, y otro de 12 células, con blastómeras simétricas y escasa fragmentación. Los seis preembriones restantes, dado que también presentaban buena morfología se criopreservaron en el estadio de 8 células con la técnica de Testard¹².

A los 12 días post-transferencia se obtuvo un valor de subunidad beta de hCG en sangre de 850 mUI/ml, a las siete semanas se realizó una ecografía con transductor vaginal observándose dos sacos gestacionales con embrión y actividad cardíaca positiva. Actualmente cursa normalmente la décimo cuarta semana.

Discusión

Son escasas y recientes las publicaciones referidas a embarazos obtenidos con ICSI y espermatozoides testiculares criopreservados^{8, 9, 13}. Las tasas de fertilización y clivaje obtenidas en este caso son tan buenas como las logradas con espermatozoides frescos, dato que difiere con lo hallado por otros autores⁸. Tal como se observa con espermatozoides eyaculados u obtenidos de epidídimo^{2, 3, 6}, los espermatozoides testiculares también conservan después de la criopreservación su capacidad de fertilizar si se emplea ICSI, a pesar del innegable deterioro que produce su congelación y descongelación. El daño potencial que pudiera sufrir el ADN durante el proceso no debe ser olvidado, pero por otra parte no existen razones para suponer que los espermatozoides de origen testicular sean más susceptibles a ese daño que aquellos de eyaculado o epidídimo con los que existe buena experiencia. Consideramos fundamental para el éxito del procedimiento que en la biopsia de testículo se observen espermatozoides móviles antes de la criopreservación y también que estos conserven aunque sea un mínimo de motilidad luego de la descongelación, ya que de esta forma puede identificarse de manera inequívoca a los espermatozoides vivos, lo cual garantiza una alta tasa de fertilización, cosa que no ocurre cuando sólo se observan espermatozoides inmóviles. A pesar de que la eficacia de la utilización de muestras de testículo criopreservado para obtener fertilización mediante ICSI debe ser confirmada a través de la realización de un número significativo de casos, los resultados obtenidos hasta ahora resultan auspiciosos para aquellos hombres que sin este recurso deberían ser sometidos a repetidas cirugías para cada nuevo intento de ICSI. La posibilidad de criopreservar y utilizar exitosamente muestras de espermatozoides de testículo, como así también de epidídimo, es un progreso importante para aquellos hombres que presentan azoospermias, particularmente si éstas son de origen obstructivo. En base a estos resultados debe darse importancia a la posibilidad de criopreservar cualquier excedente

de muestra testicular o epididimaria utilizados para un procedimiento de ICSI, como así también en las ocasiones en que se efectúan tomas de biopsia testicular con fines diagnósticos debería separarse una alícuota para criopreservar y así, en el caso de decidir la realización de una ICSI recurrir a esta alícuota sin necesidad de repetir la toma. Otra aplicación derivada de esta metodología sería la criopreservación de muestras de testículo de pacientes que deben someterse a ablación por presentar seminomas y que desean conservar para el futuro la posibilidad de procrear.

Desde su introducción en 1992, la ICSI fue rápidamente adoptada en todo el mundo para la reproducción asistida de parejas con factor masculino severo. Dado que el uso clínico de la ICSI no tuvo antecedentes en ningún modelo animal, sólo se dispone de experiencias recogidas de la evaluación de resultados obtenidos con humanos. La ICSI, al inyectar directamente un espermatozoide dentro del ovocito salta todas las barreras selectivas desarrolladas a través de millones de años de selección natural. Hasta ahora no se ha detectado ningún incremento significativo de defectos en niños nacidos mediante esta técnica. Al parecer el principal riesgo inherente a la ICSI radicaría en la posible transmisión de defectos genéticos, como microdeleciones en el cromosoma Y, que podrían perpetuar algunas formas de esterilidad masculina. Por otra parte, distintos factores tales como la adecuada selección de los espermatozoides inyectados, una buena técnica de inyección, y la selección crítica de los candidatos a ICSI atenuarían substancialmente los posibles riesgos. Teniendo en cuenta que el eventual peligro de transmitir defectos genéticos ligados a la condición de subfertilidad implica consecuencias más bien éticas y psicológicas que médicas, creemos que negar a un paciente, en lo demás normal, la posibilidad de tener un hijo en base al argumento de que podría transmitirle un defecto en la espermatogénesis implicaría un ejercicio no ético de eugenesia. Por lo tanto, consideramos que resulta esencial la información detallada a los pacientes de este riesgo potencial, y que éstos decidan libremente sobre la realización del tratamiento.

Summary

Pregnancy obtained by intracytoplasmic oocyte injection of spermatozoa retrieved from a cryopreserved testicular biopsy

We have obtained a clinical pregnancy in a 26 year old patient by means of in vitro oocyte fertilization by intracytoplasmic injection of spermatozoa obtained from a cryopreserved testicular biopsy. In a first attempt performed with fresh biopsy material, the woman became pregnant, but the pregnancy ended in a spontaneous abortion. In a second cycle, the spermatozoa were retrieved from a cryopreserved sample saved from the first attempt. Twelve metaphase II oocytes were collected and injected; from these, nine became fertilized, three preembryos were transferred at the eighth-cell stage and the other six were cryopreserved. An ongoing clinical pregnancy was obtained with two gestational sacs.

Bibliografía

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 1992; 430: 17-8.
2. Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van Steirteghem AC. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 1994; 61: 1045-51.
3. Silber S, Nagy Z, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 1994; 9: 1705-9.
4. Devroey P, Nagy Z, Tournaye H, Liu J, Silber S, Van Steirteghem AC. Outcome of intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1996; 11: 1015-8.
5. Hovatta O, Moilanen J, von Smitten K, Reima I. Testicular needle biopsy, open biopsy, epididymal aspiration and intracytoplasmic sperm injection in obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995; 10: 2595-9.
6. Oates R, Lobel S, Harris D, Pang S, Burgess C, Carson R. Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. *Hum Reprod* 1996; 11: 133-8.
7. Podsiadly B, Woolcott R, Stanger J, Stevenson K. Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of cryopreserved spermatozoa recovered from testicular biopsy. *Hum Reprod* 1996; 11: 1306-8.
8. Gil-Salom M, Romero J, Minguez Y, Rubio C, De los Santos M, Remohí J, Pellicer A. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryo-preserved testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1996; 11: 1309-13.
9. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985; 44: 493-6.
10. Pasqualini RS, Quintans C, Rey Valzacchi G, Matarasso N, Martínez M. Embarazo con espermatozoides testiculares. *Reproducción* 1995; 10: 117-20.
11. Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N, André D. Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil Steril* 1992; 58: 977-80.
12. Testard J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Frydman R. High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986; 46: 268.
13. Liu J, Tsai Y-L, Katz E, Compton G, Garcia J, Baramki T. Outcome of in-vitro culture of fresh and frozen-thawed human testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1997; 12: 1667-72.

Not only will men of science have to grapple with the sciences that deal with man but –and this is a far more difficult matter– they will have to persuade the world to listen to what they have discovered. If they cannot succeed in this difficult enterprise, man will destroy himself by his halfway cleverness.

Los hombres de ciencia no sólo tendrán que lidiar con las ciencias que conciernen al hombre sino que –y esto es mucho más difícil– tendrán que conseguir que el mundo entienda lo que han descubierto. Si no tienen éxito en esta difícil coyuntura, el hombre se destruirá a sí mismo con su mediano ingenio.

Bertrand Russell (1872-1970)