

UNIDAD DE REPRODUCCION
HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO
C/ Ramón y Cajal, 3
47005 - VALLADOLID

FACTORES PRONÓSTICOS DE ÉXITO DE TRATAMIENTO DE FECUNDACIÓN IN VITRO MEDIANTE INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA CON ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DE BIOPSIA TESTICULAR EN VARONES AZOOSPÉRMICOS

AUTORA: Inés Cortiñas Diez

**TUTORES: Julio Alberto Gobernado Tejedor
José María Fernández Gómez**

**MÁSTER EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD:
FARMACOLOGÍA, NEUROBIOLOGÍA Y NUTRICIÓN**

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 1.1. Antecedentes históricos | |
| 1.2. Procedimiento | |
| 1.3. Indicaciones | |
| 1.4. Factores pronósticos | |
| 1.4.1. Factores pronósticos de biopsia positiva | |
| 1.4.2. Factores pronósticos de éxito de ICSI y gestación positiva | |
| 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO..... | 13 |
| 3. FINALIDAD Y OBJETIVOS..... | 14 |
| 3.1. Finalidad del estudio | |
| 3.2. Objetivo principal | |
| 3.3. Objetivos secundarios | |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 15 |
| 4.1. Extracción quirúrgica de espermatozoides | |
| 4.2. Procesamiento de la muestra de tejido testicular para la realización de la ICSI de los ovocitos obtenidos | |
| 4.3. Incubación | |
| 4.4. Transferencia embrionaria | |
| 4.5. Diagnóstico de Gestación | |
| 4.6. Recogida de datos | |
| 4.7. Análisis estadístico | |
| 5. ANEXO..... | 21 |
| 5.1. Formulario de recogida de datos impreso | |
| 5.2. Formulario de recogida de datos en Access 2007® | |
| 6. BIBLIOGRAFÍA..... | 23 |

FACTORES PRONÓSTICOS DE ÉXITO DE TRATAMIENTO DE FECUNDACIÓN IN VITRO MEDIANTE INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA CON ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DE BIOPSIA TESTICULAR EN VARONES AZOOSPÉRMICOS

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se estima que el 10-15% de las parejas en edad reproductiva van a presentar un problema de fertilidad que los llevará a consultar con un especialista. Esta demanda supone aproximadamente un millón de parejas en España y va en aumento debido entre otros factores, al retraso en la edad elegida para concebir al primer hijo y a la exposición de factores ambientales desfavorables como el tabaco, los malos hábitos nutricionales o el estrés (1).

Antes de la década de los 70, era poco frecuente la consulta de una pareja por trastornos de la fertilidad, y el tratamiento se focalizaba casi exclusivamente en la mujer. A partir de 1980 comenzó a estudiarse el “factor masculino”, es decir la participación del varón en la subfertilidad de la pareja. Este factor, hoy en día, representa la causa más frecuente de infertilidad, pudiéndose afirmar que en más de la mitad de las parejas con problemas de reproducción hay un factor masculino responsable (2).

El análisis del semen constituye una de las pruebas básicas para el estudio de la fertilidad del varón. Es fundamental que tanto el número, como la movilidad y morfología de los espermatozoides sea la apropiada. De modo que cuando la calidad del semen está gravemente comprometida, se ve dificultada la asistencia a la reproducción de la pareja, siendo necesario optar por una FIV mediante inyección intracitoplasmática de un espermatozoide en un ovocito. En aquellos casos en los que es difícil obtener espermatozoides, es preciso recuperarlos mediante aspirado epididimario, aspirado testicular, o biopsia testicular.

La azoospermia se define como la ausencia de espermatozoides en el eyaculado, y afecta al 10% de los varones infértiles (3). Su diagnóstico se basa en 2 o más seminogramas obtenidos con una diferencia de 4 semanas (2). Considerando su

etiopatogenia se clasifica en pretesticular, debida a un déficit de gonadotropinas; testicular, a causa de una insuficiencia testicular primaria; o posttesticular, producida por una obstrucción de la vía seminal.

La biopsia testicular proporciona el diagnóstico de certeza de la existencia o no de espermatozoides, y, de encontrarse, permite la recuperación de los mismos para ser empleados en un programa de Fecundación in Vitro (FIV), en el caso de que su calidad sea suficiente. De no ser así sería necesario recurrir a semen de donante.

La obtención de espermatozoides se consigue mediante aspiración microquirúrgica de espermatozoides (MESA), aspirado epididimario percutáneo (PESA), aspiración de espermatozoides testiculares (TESA) o mediante biopsia testicular abierta (TESE).

Los espermatozoides extraídos se utilizarán para microinyección intracitoplasmática (ICSI) de ovocitos obtenidos en el contexto de una hiperestimulación ovárica. El remanente puede ser criopreservado para ulteriores tratamientos.

1.1. Antecedentes históricos

La primera referencia escrita que hace alusión a la obtención de embriones humanos mediante la unión artificial de un óvulo y un espermatozoide para implantarlo posteriormente en el útero se encuentra en la obra visionaria de ciencia ficción: *Un mundo Feliz* (4), de Aldous Huxley, publicada en 1932, que apasionó al público y despertó la curiosidad de la comunidad científica.

En 1934 Pincus y Enzmann, del departamento de Fisiología General de la Universidad de Harvard, publicaron un artículo que comparaba el comportamiento de ovocitos de conejo in Vivo e in Vitro, concluyendo que podían desarrollarse normalmente de forma artificial (5). Este estudio motivó a Rock y Menkin catorce años más tarde, que recuperaron 800 ovocitos durante diversas intervenciones practicadas a mujeres, exponiéndolos a espermatozoides in Vitro posteriormente, hallando cambios sugestivos de progresión en 3 de los ellos (6). Sin embargo, no fue hasta 1965 cuando se consiguió la fecundación de ovocitos humanos in Vitro en el Hospital Johns Hopkins, de la mano del Robert Edwards, Georgeanna y Howard Jones (7). En 1973 se logró el primer embarazo mediante FIV por el equipo de los profesores australianos Wood y Leeton, que no llegó a término (8); y el primer nacimiento de un bebé concebido por FIV fue el de la niña Louise Brown el 25 de Julio de 1978 en Oldham, Inglaterra (9).



Figura 1. Publicación del nacimiento de Louise Brown (10)

Las técnicas de reproducción in Vitro hasta este momento, se basaban en la obtención de las células germinales femeninas en el transcurso de intervenciones quirúrgicas. La recuperación de ovocitos dio un giro radical desde la aparición del primer sistema de aspirado folicular en 1981(11), que culminó con la aparición de un dispositivo mediante una aguja que permitía la punción folicular guiada por ecografía transvaginal en 1986 (12), facilitando la obtención de los mismos para programas de fertilidad.

Al verse incrementada la facilidad en la obtención de las células germinales aumentaron los estudios en reproducción mediante técnicas artificiales. Así en 1987 se realizó la primera microinyección de un espermatozoide en un ovocito, consiguiendo elevar las tasas de fecundación obtenidas hasta el momento (13), técnica que se conoce actualmente con el acrónimo de ICSI (intracytoplasmic sperm injection). Ésta técnica permitió mejorar la asistencia a la reproducción de varones con anomalías severas en el eyaculado.

La extracción ovocitaria había mejorado hacia técnicas más sencillas y menos invasivas, pero con respecto al varón, sólo los aquellos que presentaban espermatozoides en el eyaculado podían tomar parte en tratamientos de fertilidad, de modo que no existía ninguna alternativa terapéutica para aquellos con pocos o ningún espermatozoide. En 1985 se logró realizar la primera FIV con espermatozoides procedentes de aspirado epididimario (14) y en 1993 se publicó el primer caso de FIV mediante ICSI empleando espermatozoides recuperados de una biopsia testicular, hoy conocida como TESE (testicular sperm extraction) (15).

1.2. Procedimiento

La FIV mediante ICSI con espermatozoides recuperados por TESE es un procedimiento que se desempeña con frecuencia en la mayoría de las Unidades de Reproducción. Consiste en realizar una biopsia de tejido testicular, de la se extraerán posteriormente las células germinales masculinas, en aquellos pacientes que no tienen opción a un procedimiento convencional de FIV por presentar escasos o ningún espermatozoide en el eyaculado. Los espermatozoides recuperados pueden congelarse o ser utilizados en fresco, y en este último caso se programa la TESE sincrónicamente con la extracción ovocitaria. A continuación se realiza la FIV mediante ICSI, que consiste en la microinyección en el citoplasma de un ovocito que ha sido previamente decumulado.



Figura 2. Procedimiento de ICSI (16)

1.3. Indicaciones

La recuperación espermática mediante TESE en un programa de FIV mediante ICSI está indicado en los varones con azoospermia. El origen de éstas puede ser tanto obstructivo, debido a bloqueo mecánico entre el epidídimo y el conducto deferente (en cuyo caso siempre se obtendrán espermatozoides en la biopsia); como no obstructivo, debido a una alteración en el proceso de espermatogénesis.

1.4. Factores pronósticos

Existen múltiples factores que van a influir en mayor o menor medida tanto en el éxito de la obtención de espermatozoides en la recuperación espermática, como en la consecución de una fecundación correcta tras la ICSI, y en la evolución adecuada del embrión, consiguiendo en el mejor de los casos una gestación que va a llegar a término.

La bibliografía disponible en referencia al procedimiento de la biopsia testicular es escasa, y más aún si tenemos sólo en cuenta los factores pronósticos para la obtención de la muestra y para las tasas de fecundación, división y evolución embrionaria, así como para las tasas de embarazo.

1.4.1. FACTORES PRONÓSTICOS DE BIOPSIA POSITIVA

- Tipo de azoospermia: obstructiva o no obstructiva

El porcentaje de éxito de recuperación espermática en una biopsia testicular depende del origen de la misma, de forma que las azoospermias de origen obstructivo presentan un porcentaje de éxito del 90-100%, mientras que en las no obstructivas se consigue un discreto 49,5%. De modo que las características que apuntan a un origen obstructivo, van a ir acompañadas de una mayor probabilidad de éxito, como son: el eyaculado de escaso volumen, ácido y sin fructuosa, el adelgazamiento epididimario y la ausencia de los vasos deferentes en la exploración (3).

- Histología testicular

La histología testicular nos permite un diagnóstico certero del origen de la azoospermia, y hoy en día es aún considerado el mejor factor pronóstico de obtención de espermatozoides en una biopsia testicular (3). Se demostrado que los mejores resultados de recuperación espermática se dan en aquellas biopsias en las que se encuentran túbulos seminíferos con espermatozoides maduros (17).

- Adecuación de la muestra

Puesto que la porción de tejido testicular que se va a extraer puede contener pocos espermatozoides, es preciso que el tamaño de la muestra sea el adecuado, lo suficientemente grande para que la probabilidad de hallar células germinales sea alta, y lo suficientemente pequeña para no disminuir en exceso el volumen testicular, por la posible necesidad de biopsias testiculares para tratamientos de fertilidad futuros. La experiencia

del cirujano es importante para la correcta ejecución del procedimiento, que también va a disminuir de forma sustancial la tasa de complicaciones (3).

- FSH

La hormona folículo estimulante (FSH), va a actuar determinando el número de células de Sertoli en la etapa fetal, y además actúan a través de receptores localizados en las mismas para regular la cantidad de espermatozoides producidos (2).

Por tanto los niveles de FSH reflejan de forma indirecta la función espermatogénica global y por ello han sido empleados como marcadores de la reserva testicular. Su aumento se relaciona con las azoospermias de origen no obstructivo.

En los primeros estudios realizados se observó una relación inversa entre FSH y la tasa de recuperación espermática. Fue apoyada por investigaciones ulteriores, como en el caso del Grupo de Investigación de Mitchell, que observaron que valores de FSH inferiores a 5UI/L se asociaban a mayor éxito de recuperación espermática mediante TESE (18). Sin embargo otros autores han observado que sus valores en azoospermias no obstructivas no constituyen un factor predictivo seguro (19,20), por lo que su papel ha de ser esclarecido en el futuro.

- Inhibina B

La inhibina es péptido no esteroideo de la superfamilia del factor transformador del crecimiento β (TGF β) producido por las células de Sertoli, que actúa regulando la secreción de FSH por acción selectiva en la hipófisis. Va a actuar disminuyendo los niveles de FSH, tanto basales como tras el estímulo de GnRH, sin modificar los niveles de LH (2).

Se han relacionado sus niveles con el grado de función de las células de Sertoli, y ha sido estudiada como factor pronóstico de éxito de este tipo de tratamientos, al observarse valores reducidos en varones con disfunciones testiculares.

En el estudio realizado por Mitchell et al, se situó el punto de corte 123,5 pg/ml, de modo que aquellos pacientes que presentaban valores superiores tenían mayor probabilidad de buenos resultados.

También se objetivó que a menor volumen testicular, menores eran los niveles de esta hormona, de modo que los varones con un volumen testicular inferior a 30 ml constituían un grupo pronóstico desfavorable (18).

Boitrelle y colaboradores describieron un sistema de puntuación basado en la FSH, la inhibina B y el volumen testicular como factores pronósticos de éxito de TESE. Individualmente, la inhibina resultaba el factor pronóstico más fuerte (21).

Otros autores desmienten estas conclusiones, afirmando que los niveles plasmáticos de inhibina B no son predictivos de éxito (1).

Las investigaciones de los niveles seminales de la inhibina B tampoco resultan esclarecedores, existiendo estudios defensores y detractores de su papel (22).

De todos estos estudios se deduce que el potencial de la inhibina B como factor pronóstico está aún por determinar, no es útil actualmente como marcador de espermatogénesis por sí mismo y se necesitan más investigaciones para llegar a una solución concluyente.

- Hormona Antimülleriana (AMH)

Al igual que la inhibina B, es otra glicoproteína relacionada con el TGF β producida por las células de Sertoli, que también ha sido propuesta como marcador funcional de su actividad y de la espermatogénesis (22). Es la responsable de la regresión de los conductos de Müller en el embrión (cuya persistencia en el sexo femenino determina la aparición del útero, las trompas de Falopio y el tercio superior de la vagina) (23). Se encuentra en una concentración más elevada en el plasma seminal que en el suero, y se ha visto que sus niveles tienden a ser más bajos en varones subfértiles (24). En cuanto a sus concentraciones séricas, a pesar de los prometedores hallazgos iniciales, no se han confirmado como factor pronóstico; y la influencia de los niveles seminales de AMH aún no ha sido demostrada(22).

- Testosterona

La testosterona es una hormona que se sintetiza en las células de Leydig testiculares y permite el desarrollo de los caracteres masculinos, que van a ser los responsables en última instancia de la espermatogénesis. Varones que padecen hipogonadismos presentan valores alterados de testosterona, por lo que se ha postulado como posible factor predictivo de éxito de TESE.

En ninguno de los estudios realizados se ha encontrado una asociación clara entre los niveles de testosterona y el éxito del procedimiento (18).

- LH

La LH es una hormona que actúa a través de receptores localizados en las células de Leydig, originando una cascada de reacciones que conducen a la estimulación de la esteroidogénesis, y finalmente a la producción de testosterona (2).

Tampoco se han encontrado valores de LH que determinen el éxito de recuperación espermática mediante biopsia testicular abierta (18).

- Volumen testicular

El 80% del volumen testicular está formado por los túbulos seminíferos, de forma que el volumen ha sido descrito como factor pronóstico independiente, de modo que los varones con mayor volumen testicular, presentan mayor porcentaje de éxito en la obtención de células germinales en la recuperación espermática mediante biopsia (18,20,21).

- Factores Genéticos

Algunos tipos de azoospermia son debidas o están asociadas a anomalías genéticas, por lo que su hallazgo ensombrece el éxito de la recuperación (3).

El 13,7% de las azoospermias van a presentar anomalías cromosómicas, afectando con mayor frecuencia a los cromosomas sexuales, como el Síndrome de Klinefelter (que es la más frecuente de todas, suponiendo un 10% del total) o las Microdelecciones del brazo largo del cromosoma Y.

Las Microdelecciones del brazo largo del cromosoma Y afectan al 10-15% de los pacientes con azoospermias no obstructivas, son de novo y se transmiten a los hijos varones (por lo tienen utilidad en el consejo genético de la pareja). Han sido empleadas como factor pronóstico en la recuperación de espermatozoides en la biopsia testicular, puesto que algunas de ellas como la AZFa+b+c o las AZFa o AZFb si son completas se asocian a fracaso de la técnica (2).

- Edad varón

La edad del varón se ha descartado como factor predictivo de éxito de TESE en numerosos estudios (21). A diferencia de la mujer, no se ha podido establecer un margen de edad concluyente relacionado con la eficacia.

1.4.2. FACTORES PRONÓSTICOS DE ÉXITO DE ICSI Y DE GESTACIÓN POSITIVA.

- Tipo de azoospermia: obstructiva o no obstructiva

La FIV mediante ICSI tiene mayor porcentaje de éxito cuando los espermatozoides empleados proceden de un varón con azoospermia de origen obstructivo, alcanzando tasas de fecundación del 45-75%. En estos casos, la tasa de embarazo y de recién nacido llegan a valores del 26-57% y del 18-55% respectivamente (3,25,26). Esto puede explicarse ya que al haber un defecto severo de la espermatogénesis, los espermatozoides pueden tener afectada su capacidad para fecundar al gameto femenino y formar un embrión viable (3).

- Muestras en fresco

Algunos estudios defienden que las muestras de espermatozoides en fresco tienen mejores resultados en la ICSI (3). Otros en cambio no encuentran diferencias significativas entre el uso de esperma fresco o congelado en términos de tasa de fecundación o de tasa de gestación (27).

- FSH

Si bien no existe un nivel de FSH que sirva para asegurar la existencia de espermatogénesis, las tasas de gestación clínica son mayores en los casos en que los varones tuvieron valores más bajos (18,27). Esto se debe a que a niveles más elevados de FSH, se encuentran menor número de células germinales, y por tanto menos espermatozoides y de peor calidad.

- Morfología de los espermatozoides

A pesar de que los espermatozoides obtenidos de la TESE se encuentren en distinto estado de maduración, la mayor parte tiene morfología normal (más elevado en el caso de las azoospermias obstructivas). Además hay estudios que han probado que las características morfológicas de las células germinales testiculares, no influyen en la tasa de fertilización de la ICSI. (28) Otros apuntan que se relacionan con la tasa de fertilización, pero no con la de gestación (29).

- Edad paterna

Hasta el momento no se ha podido establecer una asociación clara entre la edad paterna y el éxito de la ICSI y de la subsiguiente evolución de la gestación.

En la literatura disponible, las investigaciones de Schiff y colaboradores no encontraron correlación entre la edad y el porcentaje de fecundación (29). En el estudio de Ghanem et al no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en

cuanto a edad que determinaran su papel como factores pronósticos de éxito de ICSI en lo que a tasa de fecundación, tasa de implantación o tasa de gestación se refiere (27).

- Variables Femeninas

El papel del factor femenino ha sido ampliamente estudiado en relación a los resultados obtenidos en FIV mediante ICSI.

En el estudio realizado por Moon y Colaboradores se propuso la edad como factor pronóstico en un programa de ICSI, al haber encontrado una correlación lineal con el número de ovocitos recuperados, la tasa de gestación y la disminución de la tasa de aborto espontáneo (30).

Posteriormente Altay y su grupo de investigación observaron tasas de gestación más elevadas en las mujeres con edades comprendidas entre 20 y 29 años (31).

Sin embargo, Verza y Esteves no encontraron asociación significativa en cuanto a edad de la mujer o número de ovocitos maduros recuperados (26).

De todo esto se deduce que hacen falta más estudios para determinar el papel de las variables femeninas en el éxito de un programa de FIV-ICSI.

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Realizar un programa de FIV mediante ICSI, extrayendo los espermatozoides de una biopsia testicular, supone un consumo de recursos materiales, económicos, personales y temporales mucho más elevados que en el caso de realizar un procedimiento clásico de fecundación in Vitro. Las células germinales empleadas son escasas y no han completado su maduración ni capacitación; por lo que los embriones obtenidos en ocasiones no presentan la más óptima calidad. Las técnicas de recuperación espermática aunque son mínimamente invasivas, no están exentas de complicaciones, entre las que se citan dolor crónico, edema, infección, hidrocele y hematomas. Además se ha demostrado que en biopsias testiculares amplias o repetidas se produce un descenso transitorio o permanente de los niveles séricos de testosterona, debido a la revascularización testicular (29).

Por lo tanto resultaría de gran utilidad discriminar los parámetros que van a determinar el éxito del procedimiento, de modo que se realizase en los individuos más idóneos, rentabilizando recursos. También se lograría disminuir el impacto emocional que supone en la pareja la elección de un tratamiento que no proporciona resultados, y ganar tiempo para otras alternativas terapéuticas más rentables a nivel individualizado, que tan importante es en la asistencia a la subfertilidad.

3. FINALIDAD Y OBJETIVOS

3.1. Finalidad del estudio

La finalidad del estudio consiste en analizar factores predictores de obtención de espermatozoides mediante biopsia testicular que sean útiles para el empleo en un programa de fecundación in Vitro mediante ICSI, así como factores predictores de éxito tanto en el procedimiento para obtener embriones viables, como de ulterior gestación.

3.2. Objetivo principal

El objetivo principal del presente estudio es analizar la tasa de fecundación, tasa de división, calidad embrionaria y tasa de gestación, resultantes de ovocitos fecundados mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides obtenidos mediante biopsia testicular.

3.3. Objetivos secundarios

En primer lugar detectar que factores pueden predecir la obtención de espermatozoides en una biopsia testicular practicada en varones con azoospermia.

Como siguiente objetivo, investigar los factores predictivos de éxito del procedimiento de ICSI con el empleo de espermatozoides obtenidos en el contexto de una biopsia testicular, valorados en forma de tasa de fecundación, tasa de división, y calidad embrionaria.

Por último se analizará la existencia de valores que permitan predecir la tasa de gestación del programa de FIV mediante ICSI con la utilización de espermatozoides extraídos de una muestra obtenida por biopsia testicular.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha diseñado un estudio observacional retrospectivo cuya población de estudio son los varones con diagnóstico de azoospermia o criptoospermia con indicación para biopsia testicular, así como sus respectivas parejas, tratados en la Unidad de Reproducción del Hospital Clínico Universitario de Valladolid desde Enero de 1999 a Diciembre de 2011.

De la Historia clínica del hombre se recogerán: edad, antecedentes personales relacionados con la azoospermia, causa de la misma (agrupada como: de tipo desconocido, consecuencia de hipogonadismo, gonadotóxicos, criptorquidia, traumatismo o torsión, orquitis, vasectomía, agenesia de deferentes, yatrógena, enfermedades infecciosas del tracto genitourinario, epididimitis, eyaculación retrógrada y aneyaculación, siendo el resto clasificadas como otras causas) y tiempo de evolución. También se obtendrán los valores hormonales de FSH, LH, testosterona, prolactina y TSH.

De la Historia clínica de la mujer se recopilarán: edad, fórmula obstétrica, existencia de esterilidad primaria o secundaria (en el caso de ésta última, la causa desencadenante, clasificada como desconocida, debida a obstrucción tubárica, endometriosis, anovulación, y un último grupo con el resto catalogado como “otras causas”). Se recogerán asimismo los niveles hormonales de FSH, LH, estrógenos, prolactina y TSH.

Del tratamiento de estimulación ovárica para FIV, se obtendrán el tipo de protocolo de estimulación ovárica realizado y la duración del mismo en días, las dosis de FSH/LH inicial y total, el número de folículos de más de 16 mm y el valor de estradiol en suero el día de la inducción de la ovulación. Si se consiguió embarazo con el tratamiento y llegó a término, y se anotará el estado del recién nacido.

| HOMBRE | MUJER |
|---|-----------------------------------|
| Edad | Edad |
| Antecedentes personales relacionados | Fórmula obstétrica |
| Causa y tiempo evolución de azoospermia | Esterilidad primaria/secundaria |
| FSH, LH, testosterona, PRL y TSH | FSH, LH, estrógenos, PRL y TSH |
| | Protocolo de estimulación ovárica |
| | Embarazo y recién nacido |

Del los archivos del Laboratorio de Biología de la Unidad de Reproducción se recogerán parámetros relacionados con la biopsia testicular (fecha de la misma, número de espermatozoides obtenidos y la motilidad de los mismos), con la realización de la ICSI (fecha, número de ovocitos obtenidos en metafase II, recuento de espermatozoides móviles-REM de la muestra congelada), con el proceso de fecundación (tasa de fecundación) con el crecimiento embrionario (tasa de división embrionaria, número de embriones en el segundo, tercer, cuarto y quinto días, recuento y calidad de los embriones transferidos y congelados), y con la consecución última de la gestación (tasas de gestación bioquímica, evolutiva y múltiple, y tasa de recién nacido)

4.1. Extracción quirúrgica de espermatozoides

El procedimiento de biopsia testicular se realizó con carácter ambulatorio y con anestesia local, no siendo necesario ningún tipo de preparación especial, salvo el rasurado genital. Se practicó de forma unilateral, escogiendo siempre el testículo de mayor volumen y que no presentaba cicatrices de cirugías anteriores. Se infiltró la parte alta del cordón espermático con 10 ml de Mepivacaína al 2%. Se inmovilizó el testículo contra las cubiertas y se realizó una segunda infiltración en zona de la piel en que se va a incidir. Se procedió a la apertura de piel, dartos y vaginal testicular. Se colocó un blefarostato para tener buen acceso al campo quirúrgico, inmovilizando el testículo mediante una pinza hemostática tipo Mosquito, colocada en la cara anterior de la albugínea 1cm por debajo de la cabeza del epidídimo. Se realizó la apertura de la albugínea 10-12mm por debajo de la pinza, y se extrajo la pulpa testicular mediante ligera presión lateral sobre el testículo para que protruñera por la incisión y se pudiera cortar con facilidad, obteniendo un volumen aproximado de 0,5 cc.

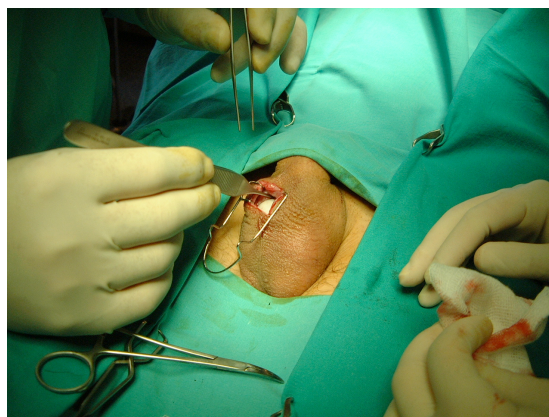


Figura 3. Procedimiento de TESE

La muestra obtenida se colocó en una placa de Petri con medio de cultivo Ham F-10[®] (de la casa comercial Invitrogen) para su procesamiento en el laboratorio. Se realizó hemostasia cuidadosa y cierre de la vaginal testicular con sutura continua multifilamento de poliglicólico de 3/0. Se finalizó el procedimiento con cierre del resto de los planos con sutura discontinua multifilamente de poliglicólico de reabsorción rápida de 3/0.

4.2. Procesamiento de la muestra de tejido testicular para la realización de la ICSI de los ovocitos obtenidos

A partir del tejido testicular extraído, se obtuvieron los espermatozoides por métodos mecánicos, mediante la dislaceración de la muestra con 2 portas y bisturí. Tras esto se realizó una primera inspección al microscopio y se congeló la muestra en criotubos que se almacenaron en nitrógeno líquido a -196°C.

El día previsto para la realización de la ICSI, la muestra de tejido testicular se descongeló y se procesó mediante un gradiente de densidad. Con esta técnica se consiguen eliminar los restos celulares, los restos hemáticos, y las formas inmaduras.

Para ello se trabajó en una campana de flujo horizontal, y todos los medios empleados en el tratamiento de la muestra (de la casa comercial Vitrolife) fueron atemperados a 37°C y, salvo el medio tampón, al 6% de CO₂.

En primer lugar en un tubo de ensayo se vertieron 1,5 ml de solución de sílice coloidal Spermgrad[®], diluída al 90% con G-IVF plus[®], por encima de ésta 1,5 ml de la misma solución madre diluída al 45%, y finalmente se añadió la muestra de tejido testicular. A continuación se centrifugó a 600 g durante 18 minutos. Al extraer el tubo se eliminó el sobrenadante, respetando el pellet. Se añadieron 2 ml de medio G-IVF plus[®] y se centrifugó 4 minutos a 600 g. Se dejó 0,25 ml de sobrenadante del tubo, desechando el resto. Por otro lado, se preparó una placa de Petri con gotas de solución tampón, y en cada una ella se depositaron los ovocitos. Asimismo se vertió una gota de polivinilpirralidona (PVP), y el espacio restante de la placa se rellenó con las gotas de pentoxifilina que tuvieron cabida. La muestra junto con el sobrenadante del tubo se vertió en las gotas de pentoxifilina, que actúa activando la motilidad de los espermatozoides, que hasta entonces se encontraban inmóviles (32). Se cubrió la placa de Petri con aceite mineral y se examinó al microscopio invertido. Se cargaron las agujas de microinyección y de sujeción del ovocito. Con la aguja de microinyección se seleccionaron los espermatozoides de mejores características de las gotas de Pentoxifilina, que se

transportaron a la gota de PVP para fragmentarles la cola. Se cargaron varios espermatozoides en dicha aguja y se microinyectaron uno en cada uno de los ovocitos obtenidos. Los ovocitos microinyectados se extrajeron de la placa de Petri en la campana, se colocaron en una placa de cultivo con medio G1 plus[®], y se dejaron incubar.

4.3. Incubación

Se incubaron los ovocitos microinyectados a 37°C, con un 6% de CO₂ y una humedad del 95%.

A las 17-21 horas se revisaron en el microscopio electrónico para ratificar la fecundación, anotando el número de pronúcleos y corpúsculos polares (puesto que la presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculares son signo de correcta fecundación), y eliminando los triploides. Si hubiera triploides sería necesario eliminarlos en este momento, puesto que más adelante resultarían indiferenciables de los embriones normales. A las 48 horas se comprobó de nuevo el estado de los embriones, que debían haberse dividido. Se observó la calidad embrionaria en función del número de blastómeras y de la presencia de residuos citoplasmáticos.

4.4. Transferencia embrionaria

La transferencia embrionaria se realizó en día+2 o día+3; cuando se observaron 3 o menos embriones de buena calidad, que es el máximo número de embriones que pueden ser transferidos a una paciente según la ley 14/2006 sobre técnicas de reproducción asistida (32). Si en el día+3 se encontraron un mínimo de 4 embriones de buena calidad, se dejaron en cultivo hasta el día de la transferencia, en que se transfirieron un máximo de 2.

Se realizó en una sala adyacente al laboratorio de FIV, previo lavado cervical con suero fisiológico. Se identificó a la paciente antes de la transferencia embrionaria, que se realizó guiada con ecografía transvaginal. La paciente permaneció en reposo 30 minutos, tras lo cual fue dada de alta con 200 mg de progesterona micronizada vía vaginal.

4.5. Diagnóstico de Gestación

Se diagnosticó el estado de gestación mediante el aumento de los niveles de β hCG en el día 14 \pm 1 postransferencia.

Se realizó ecografía endovaginal para realizar el diagnóstico de gestación clínica en la 5ª semana postransferencia, considerándose gestación clínica aquella en la que se identificó vesícula gestacional con esbozo embrionario con latido.

4.6. Recogida de datos

Se diseñó un formulario para la recogida de datos (Anexo 1) y una base de datos en Access 2007® (Anexo 2) para el manejo de los mismos.

Se realizará exportación de los datos al programa SPSS® v.15.0 para su ulterior análisis estadístico.

El presente estudio cuenta con la aprobación de la comisión de investigación del hospital, y los datos serán protegidos según lo indicado en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal. Se respetaron las normas internacionales de protección de datos, así como la legislación española vigente

4.7. Análisis estadístico

Se utilizará el programa SPSS® v.15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) para los cálculos estadísticos.

El estudio estadístico descriptivo se realizará mediante la determinación de los estadísticos descriptivos para las variables continuas aplicando la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de su distribución. En dicho caso los datos se expresarán mediante la media, rango y desviación estándar y representados mediante histogramas. En caso contrario, se empleará la mediana y el intervalo intercuartílico (Q1-Q3).

Las variables cuantitativas discretas y las categóricas se describirán por medio de distribución de frecuencias y representaciones gráficas mediante diagramas de sectores o de barras.

La comparación de medias se hará mediante la prueba de t de Student para muestras independientes en variables con distribución normal y la de U de Mann-Whitney en caso de distribución no-normal. La comparación de proporciones se realizará mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2), aplicando la corrección de Yates para tablas 2x2 y la prueba exacta de Fisher cuando las frecuencias observadas sean inferiores a 5 en el 20% o más de las casillas de la tabla de contingencia.

En todos los casos se considerará la diferencia como estadísticamente significativa a partir de valores de p inferiores a 0,05.

5. ANEXO

5.1. Formulario de recogida de datos impreso

FORMULARIO DE RECOGIDA DE DATOS

HOMBRE

NOMBRE _____ APELLIDOS _____

Nº HISTORIA _____ FECHA NAC _____

AZOOSPERMIA

| | | |
|------------|-------------------------|----------------------|
| Pretest | 0.Causa desconocida | |
| Testicular | 1.Hipogonadismo | 8.Yatrógena(Qx) |
| | 2.Gonadotóxicos (QT,RT) | 9.Enf infecciosas GU |
| | 3.Criptorquidia | 10.Epididimitis |
| | 4.Traumatismo, torsión | 11.Retrorgrada |
| | 5.Orquitis | 12.Aneyaculación |
| Postest | 6.Vasectomía | |
| | 7.Agenesia deferentes | 13. Otras _____ |

HORMONAS

FSH _____ mUI/ml
LH _____ mUI/ml
Testosterona _____ ng/ml
PRL _____ ng/ml
TSH _____ mUI/l

BIOPSIA

Fecha _____ Tipo: Uni/Bi lateral

EspERMatozoides/c _____ Motilidad basal _____

NOTAS _____

MUJER

NOMBRE _____ APELLIDOS _____

Nº HISTORIA _____ FECHA NAC _____

AGO: FO: Gestaciones _____ Pretérmino _____ Abortos _____ Fetos muertos _____ R.n. vivos _____

ESTERILIDAD primaria/secundaria:

0.Causa no conocida
1.Obstrucción tubárica
2.Endometriosis
3.Anovulación
4.Otros _____

HORMONAS

FSH _____ mUI/ml
LH _____ mUI/ml
E2 _____ pg/ml
PRL _____ ng/ml
TSH _____ mUI/l

NOTAS _____

5.2. Formulario de recogida de datos en Access 2007®

| FACTORES PRONÓSTICOS ICSI-TESE | | | | |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|
| Nº H varón | NOMBRE varón | APELLIDOS varón | FECHA NAC varón | |
| <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| AZOOSPERMIA | NOTA otras causas azoosp | | | |
| <input type="text"/> | <input type="text"/> | | | |
| FSH varón | LH varón | TESTOSTERONA | PRL varón | TSH varón |
| <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| FECHA BIOPSIA | SP/C | CNCENTR SP (mill) | % MOTILIDAD BASAL | |
| <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | |
| Nº H mujer | NOMBRE mujer | APELLIDOS mujer | FECHA NAC mujer | |
| <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | |
| GESTACIONES | PRETÉRMINO | ABORTOS | FETOS MUERTOS | RN VIVOS |
| <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| ESTERILIDAD SECUNDARIA | CAUSA ESTERILIDAD SECUNDARIA | | NOTA otras causas est secundaria | |
| <input type="checkbox"/> | <input type="text"/> | | <input type="text"/> | |
| FSH mujer | LH mujer | E2 | PRL mujer | TSH mujer |
| <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> |

Registro: 1 de 1 Sin filtro Buscar

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Mitchell V, Boitrelle F, Pigny P, Robin G, Marchetti C, Marcelli F, et al. Seminal plasma levels of anti-Müllerian hormone and inhibin B are not predictive of testicular sperm retrieval in nonobstructive azoospermia: a study of 139 men. *Fertil. Steril.* 2010 Nov;94(6):2147–50.
2. Cruz Navarro N. *Tratado de Andrología y Medicina Sexual*. Madrid: Panamericana; 2011.
3. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Int Braz J Urol.* 2011 Oct;37(5):570–83.
4. Huxley A. *Brave new world*. Chatto & Windus; 1932.
5. Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mamalian eggs in vivo and in vitro. *J Exp Med.* 1935 Oct 31;62(5):665–75.
6. Rock J, Menkin MF. In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1948 Mar;55(3):440–52.
7. Edwards RG, Donahue RP, Baramki TA, Jones HW Jr. Preliminary attempts to fertilize human oocytes matured in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1966 Sep 15;96(2):192–200.
8. De Kretzer D, Dennis P, Hudson B, Leeton J, Lopata A, Outch K, et al. Transfer of a human zygote. *The Lancet.* 1973 Sep;302(7831):728–9.
9. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 1978 Aug 12;2(8085):366.
10. Imagen de la publicación del nacimiento de Louise Brown. http://blog.oncofertility.northwestern.edu/wp-content/uploads/2010/10/louise_brown1.jpg;
11. Wood C, Leeton J, Talbot JM, Trounson AO. Technique for collecting mature human oocytes for in vitro fertilization. *Br J Obstet Gynaecol.* 1981 Jul;88(7):756–60.
12. Feichtinger W, Kemeter P. Transvaginal sector scan sonography for needle guided transvaginal follicle aspiration and other applications in gynecologic routine and research. *Fertil. Steril.* 1986 May;45(5):722–5.
13. Laws-King A, Trounson A, Sathananthan H, Kola I. Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. *Fertil. Steril.* 1987 Oct;48(4):637–42.
14. Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA, Trounson AO, de Kretser DM. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1985 Sep;2(3):119–22.
15. Silber SJ, Nagy ZP, 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 Sep;9(9):1705–9.

16. Imagen de ICSI. <http://www.creaconceptions.com/images/icsi.jpg>;
17. Abdel Raheem A, Garaffa G, Rushwan N, De Luca F, Zacharakis E, Raheem TA, et al. Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *BJU International*. 2012 May 15;
18. Mitchell V, Robin G, Boitrelle F, Massart P, Marchetti C, Marcelli F, et al. Correlation between testicular sperm extraction outcomes and clinical, endocrine and testicular histology parameters in 120 azoospermic men with normal serum FSH levels. *Int. J. Androl*. 2011 Aug;34(4):299–305.
19. Ramasamy R, Lin K, Gosden LV, Rosenwaks Z, Palermo GD, Schlegel PN. High serum FSH levels in men with nonobstructive azoospermia does not affect success of microdissection testicular sperm extraction. *Fertil. Steril*. 2009 Aug;92(2):590–3.
20. Turunc T, Gul U, Haydardedeoglu B, Bal N, Kuzgunbay B, Peskircioglu L, et al. Conventional testicular sperm extraction combined with the microdissection technique in nonobstructive azoospermic patients: a prospective comparative study. *Fertil. Steril*. 2010 Nov;94(6):2157–60.
21. Boitrelle F, Robin G, Marcelli F, Albert M, Leroy-Martin B, Dewailly D, et al. A predictive score for testicular sperm extraction quality and surgical ICSI outcome in non-obstructive azoospermia: a retrospective study. *Hum. Reprod*. 2011 Dec;26(12):3215–21.
22. Toulis KA, Iliadou PK, Venetis CA, Tsametis C, Tarlatzis BC, Papadimas I, et al. Inhibin B and anti-Mullerian hormone as markers of persistent spermatogenesis in men with non-obstructive azoospermia: a meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Hum. Reprod. Update*. 2010 Dec;16(6):713–24.
23. Sadler TW. Langman. *Embriología médica con orientación clínica*. 8^a ed. Madrid: Panamericana; 2002.
24. Fénichel P, Rey R, Poggioli S, Donzeau M, Chevallier D, Pointis G. Anti-Müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod*. 1999 Aug;14(8):2020–4.
25. Nicopoullou JDM, Gilling-Smith C, Almeida PA, Norman-Taylor J, Grace I, Ramsay JWA. Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis. *Fertil. Steril*. 2004 Sep;82(3):691–701.
26. Verza S Jr, Esteves SC. Sperm defect severity rather than sperm Source is associated with lower fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection. *Int Braz J Urol*. 2008 Feb;34(1):49–56.
27. Ghanem M, Bakr NI, Elgayaar MA, El Mongy S, Fathy H, Ibrahim A-HA. Comparison of the outcome of intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia in the first cycle: a report of case series and meta-analysis. *Int. J. Androl*. 2005 Feb;28(1):16–21.
28. Yavetz H, Yogev L, Kleiman S, Botchan A, Hauser R, Lessing JB, et al. Morphology of testicular spermatozoa obtained by testicular sperm extraction in obstructive and nonobstructive azoospermic men and its relation to fertilization success in the in vitro

fertilization-intracytoplasmic sperm injection system. *J. Androl.* 2001 Jun;22(3):376–81.

29. Schiff JD, Luna M, Barritt J, Duke M, Copperman A, Bar-Chama N. The morphology of extracted testicular sperm correlates with fertilization but not pregnancy rates. *BJU Int.* 2007 Dec;100(6):1326–9.
30. Moon SY, Kim SH, Jung BJ, Jee BC, Suh CS, Lee JY. Influence of female age on pregnancy outcome in in vitro fertilization and embryo transfer patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2000 Feb;26(1):49–54.
31. Altay B, Kefi A, Tavmergen E, Cikili N, Semerci B, Tavmergen Goker E. The effects of female age on the outcome of testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with azoospermia. *Int Urol Nephrol.* 2002;33(1):95–9.
32. Ramasamy R, Yagan N, Schlegel PN. Structural and functional changes to the testis after conventional versus microdissection testicular sperm extraction. *Urology.* 2005 Jun;65(6):1190–4.