



Embarazo después de ICSI con espermatozoides inmóviles posprueba hipoosmótica

Paloma del Carmen Neri Vidaurre, ¹ Ranferi Gaona Arreola, ^{1,2} Claudio Francisco Serviere Zaragoza¹

RESUMEN

Se comunica un caso de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) inmóviles obtenidos por extracción testicular (TESE) de un paciente con ausencia congénita bilateral de vías deferentes, heterocigoto para la mutación 2789+5G>A del gen CFTR de la fibrosis quística, que es la causa genética más común en la azoospermia obstructiva y afecta a 98% de los varones con fibrosis quística. Durante el ciclo de la inyección, se utilizó la prueba hipoosmótica para la identificación de espermatozoides viables ante la astenozoospermia total de la muestra, previa prueba de viabilidad. Se microinyectaron cinco ovocitos en metafase II; cuatro se fertilizaron y tres se segmentaron y se transfirieron 48 horas después. El soporte de fase lútea se realizó con progesterona micronizada intramuscular, iniciando el día de la captura; 14 días después de la transferencia, se reportó una fracción β -HCG de 244.1 mUI/mL, y se confirmó mediante ultrasonido un embarazo clínico con embrión vivo. Aunque sólo se ha reportado un caso exitoso de inyección intracitoplasmática de espermatozoides con espermatozoides inmóviles combinada con prueba hipoosmótica, esta última técnica se recomienda como una opción al uso de la pentoxifilina para obtener espermatozoides viables con la misma oportunidad de llevar a cabo la fertilización, desarrollo embrionario y embarazo normal para pacientes con astenozoospermia total.

Palabras clave: ICSI, espermatozoides inmóviles, prueba hipoosmótica.

ABSTRACT

This paper reports a case of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with immobile sperm obtained by testicular sperm extraction (TESE) in a patient with congenital bilateral absence of the vasa deferentia (BAVD), heterozygous for the mutation 2789+5G>A of the CFTR gene of cystic fibrosis, which is the most common genetic cause of obstructive azoospermia and is present in up to 98% men with cystic fibrosis. During the cycle of ICSI, the hypo-osmotic swelling test (HOS) was used for the identification of viable spermatozoa in the sample with total astenozoospermia. Five oocytes were injected, with fertilization in 4 and cleavage in 3, which were transferred at 48 h. The pregnancy test was performed on days 14 post-transfer reporting 244.1 UI/mL of β -HCG, a viable embryo was confirmed by ultrasonography. Although only one successful case was reported with ICSI using non-motile sperm combined with HOS, this technique is recommended as an alternative to the use of pentoxifylline to identify viable sperm with a realistic chance of achieving fertilization, embryonic development and normal pregnancy in patients with total astenozoospermia.

Key words: ICSI, immobile sperm, hypo-osmotic test.

¹ Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana, Hospital Ángeles, México, DF.
² Hospital Médica Sur, México, DF.

Correspondencia: Maestra en ciencias Paloma del Carmen Neri Vidaurre. Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana. Hospital Ángeles México. Agrarismo 208, 1^{er} piso, torre A, interior 102, colonia Escandón, CP 11800, México, DF. Correo electrónico: palnevi@ceerh.com.mx

Recibido: septiembre, 2012. Aceptado: diciembre, 2012.

Este artículo debe citarse como: Neri-Vidaurre PC, Gaona-Arreola R, Serviere-Zaragoza CF. Embarazo después de ICSI con espermatozoides inmóviles posprueba hipoosmótica. Rev Mex Reprod 2013;5:149-153.

Durante las dos últimas décadas, las técnicas de reproducción asistida han tenido importantes avances, sobre todo a partir de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que es un parteaguas en el tratamiento y pronóstico de varones con alteraciones seminales y azoospermia obstructiva o no obstructiva, quienes lograron al fin tener un hijo propio.¹

En particular, la ausencia congénita bilateral de los vasos deferentes provoca entre 6 y 8% de los casos de azoospermia obstructiva; dos terceras partes de este porcentaje tienen fibrosis quística, aunque sin eviden-

cia clínica de la enfermedad, ya que está vinculada con mutaciones menos severas.^{2,3} En 1989, gracias a la disponibilidad de un gran número de familias con dos o más individuos afectados, se logró la clonación del gen responsable de la fibrosis quística (CFTR/ABCC7, OMIM #602421), llamado regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CTRF).^{3,4}

En los pacientes afectados hay un defecto en el desarrollo embrionario de los conductos de Wolf, que produce agenesia en el cuerpo y la cola de los epididímos, conductos deferentes y vesículas seminales; y aunque la función testicular de los pacientes suele ser normal, la mayoría de ellos sufre azoospermia obstructiva.⁵ Si bien la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides ha resuelto con éxito el problema de infertilidad en estos pacientes por medio de la aspiración percutánea epididimaria y la biopsia testicular abierta, al transmitirse la fibrosis quística como un rasgo autosómico recesivo, la identificación de una mutación en el gen CTRF en un paciente con ausencia congénita bilateral de los vasos deferentes implica que debe buscarse una mutación en el gen CTRF en su pareja.⁵

En la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides está implícita la inyección de espermatozoides móviles. En este estudio se describe un embarazo logrado después de una inyección intracitoplasmática de espermatozoides inmóviles de un paciente con ausencia congénita bilateral de los vasos deferentes heterocigoto para la mutación CTRF para fibrosis quística; para la identificación e inyección de espermatozoides viables se usó la prueba hipoosmótica.

CASO CLÍNICO

Una pareja con esterilidad primaria –formada por una mujer de 28 años de edad, con estudio básico de la pareja estéril sin problemas aparentes, y un varón de 54 años, con diagnóstico de factor masculino con azoospermia obstructiva por ausencia congénita bilateral de los vasos deferentes– se refirió al Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana (CEERH).

En la evaluación integral en la pareja se observó histerosalpingografía con cavidad uterina normal sin defectos de llenado, con ambas salpinges móviles y permeables; perfil hormonal femenino y tiroideo normales;

cultivos vaginales y seminales negativos para *Chlamydia* y *Mycoplasma* y anticuerpos anti-VIH negativos.

El varón, en la consulta de andrología, refirió conocer la ausencia congénita bilateral de los vasos deferentes, la cual se corroboró mediante exploración física y ultrasonido testicular, que también mostró ambos testículos con forma y tamaño normales. El análisis del semen indicó un volumen menor de 1 mL, pH de 7.5 y azoospermia poscentrifugación.

Se envió a los dos miembros de la pareja al laboratorio de biología molecular para el estudio de fibrosis quística que detecta las 23 mutaciones recomendadas por el Colegio Americano de Genética Médica y el Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia. Las mutaciones se identifican por medio de un ensayo de ligación de oligonucleótidos después de la amplificación de las regiones específicas del gen CTRF por reacción en cadena de la polimerasa. Los productos de la reacción alelo específicos fluorescentes se detectan por electroforesis capilar automática. La mujer fue negativa para las 23 mutaciones y el varón fue heterocigoto para la mutación 2789+5G>A, lo que indicó que tenía una mutación en el gen de la fibrosis quística consistente en estado de portador no afectado. Después de hacerlo del conocimiento de la pareja y del Comité de Ética del Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana, en presencia del médico tratante y del médico genetista, se comenzó tratamiento para un ciclo de fecundación *in vitro*-inyección intracitoplasmática de espermatozoides con obtención de espermatozoides por medio de extracción testicular.

Se inició hiperestimulación ovárica controlada bajo protocolo convencional con hormona foliculoestimulante recombinante (FSH-r, Gonal-F®, folitropina alfa, Merck-Serono de México) más antagonista de hormona liberadora de gonadotrofina (a-GnRH, Orgalutrán®, ganirelix, MSD México) y foliculografía seriada. La dosis se mantuvo hasta lograr el desarrollo de un folículo dominante de 18 mm, día en el que se aplicaron 10,000 UI de gonadotrofina coriónica (Pregnyl®, MSD México), y 36 horas después se programó captura ovular.

Posterior a la captura ovular se programó la extracción testicular, iniciando en el testículo izquierdo, de donde se obtuvo un pequeño segmento de tejido que se lavó inmediatamente con medio de cultivo HTF-hepes

(Human Tubal Fluid HEPES Buffered, Irvine Scientific®, Santa Ana, CA) suplementado con 10% de albúmina sérica humana (Human Serum Albumin, LifeGlobal® Canada-EUA), previamente atemperada a 37°C. En el laboratorio, en dos portaobjetos estériles, se disgregó el tejido minuciosamente y bajo el microscopio estereoscópico 1X71 (Olympus®, MidAtlantic Diagnosis, Inc. Japón) se determinó la existencia de espermatozoides y su movilidad. A la observación se registró la presencia de 10 a 12 espermatozoides por campo, sin movilidad, por lo que se decidió efectuar una biopsia en el testículo derecho, que arrojó los mismos resultados. Ambos tejidos se colectaron con una pipeta Pasteur de vidrio estéril y se colocaron en un tubo cónico de 15 mL; se agregó aproximadamente 1 mL de medio HTF-hepes suplementado con albúmina sérica humana a 10% y se centrifugó durante cinco minutos a 1,500 rpm. El sedimento se colocó en un tubo cónico con minigradientes de Isolate (Irvine Scientific®, Santa Ana, CA), se centrifugó 10 minutos a 1,200 rpm y el sedimento se resuspendió en 200 a 300 µL de HTF-hepes suplementado a 10% con albúmina sérica humana.

Se obtuvieron 2 millones de espermatozoides inmóviles, por lo que se realizó prueba de viabilidad con eosina a 5%, y se encontró 45% de espermatozoides vivos. Ante la ausencia de pentoxifilina, se indujo bioquímicamente la movilidad mediante prueba hipoosmótica, la cual se utiliza para estudiar la viabilidad de una muestra de semen y evalúa el estado anatomofuncional de la membrana plasmática del espermatozoide; ya que la integridad y permeabilidad de la membrana es fundamental para el metabolismo espermático y para todas las etapas implicadas en el proceso de fertilización.

Los espermatozoides se colocaron en una solución hipoosmótica y los que fueron capaces de incorporar agua e hinchar el flagelo se consideraron viables y con permeabilidad de la membrana normal. Inmediatamente después de la identificación, se lavaron tres veces los espermatozoides viables para remover los restos de la solución hipoosmótica y se colocaron en microgotas de polivinilpirrolidona (PVP, InVitroCare® Inc. Frederick, MD) sobre la placa de inyección intracitoplasmática previamente preparada. Para el procedimiento, el flagelo del espermatozoide se golpeó antes de la inyección al

ovocito (procedimiento estándar para la inyección intracitoplasmática de espermatozoides).

De un total de seis ovocitos capturados después de la decumulación de las células de la granulosa, se encontró uno en la vesícula germinal y cinco en metafase II, los cuales se inyectaron y se dejaron en medio G1.5 plus (Vitrolife®, Suecia AB, Kungsbacka, Suecia). A las 18 horas, se corroboraron pronúcleos en cuatro de ellos, que se cultivaron en medio G1.5 plus; 48 horas después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, se programó transferencia embrionaria de tres embriones en estadio de cuatro células sin fragmentos (Figura 1); el cigoto restante se arrestó en dos pronúcleos.

Después de la transferencia embrionaria, el soporte de fase lútea se realizó con progesterona micronizada intramuscular. A los 14 días se realizó determinación sérica de fracción β-hCG, que fue de 244.1 mUI/mL. Se confirmó el embarazo clínico por ecografía endovaginal, con la que se observó un saco gestacional con embrión de seis semanas de gestación y latido cardiaco. A las 38 semanas se practicó la cesárea por elección. Se obtuvo una recién nacida sana.

DISCUSIÓN

A los pacientes con azoospermia obstructiva con ausencia congénita bilateral de los vasos deferentes se les



Figura 1. Embriones obtenidos después de una ICSI con espermatozoides inmóviles tras la prueba hipoosmótica en el día 2. Se observa un embrión en cuatro células sin fragmentos y dos embriones, también con cuatro células, pero irregulares, sin fragmentos.

pueden aplicar técnicas de recuperación espermática para obtener espermatozoides con el fin de utilizarlos en la reproducción asistida.

En este trabajo, la tasa de fertilización con espermatozoides inmóviles después de la prueba hipoosmótica fue de 80% y la de división embrionaria fue de 75%.

Después de que Palermo introdujera la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en 1992, ésta se convirtió en el tratamiento de elección para pacientes con oligo-asteno-teratozoospermia severa, previa falla en la fertilización o azoospermia.^{6,7} Esta técnica ha sido muy exitosa cuando se usan espermatozoides móviles. En 1996, Nijs y su grupo identificaron a pacientes que podrían beneficiarse con la inyección intracitoplasmática. Demostraron que los espermatozoides inmóviles, independientemente de su origen (eyaculado, epidídimo o testículo), tienen la capacidad de fertilizar a un ovocito mediante la inyección intracitoplasmática, de manera que pacientes con ausencia total de movilidad, necrozoospermia o anticuerpos anti-espermatozoides también pueden beneficiarse con esta técnica; aunque las tasas de fertilización y embarazo son más bajas cuando se usan espermatozoides móviles.⁸⁻¹⁰

Una posible estrategia para solventar este problema es la prueba hipoosmótica, que es una técnica sencilla, práctica y no tóxica debido a las sustancias fisiológicas usadas, pues identifica espermatozoides con la membrana celular intacta. En la bibliografía hay alrededor de 20 artículos que tratan del uso de esta prueba para seleccionar espermatozoides viables en casos de astenozoospermia severa o total. Casper, en 1996, reportó una tasa de fertilización de 43% con la aplicación de la prueba hipoosmótica antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides vs 26% cuando los espermatozoides se seleccionaron al azar.¹¹ Liu, en 1997, en tres casos de pacientes con astenozoospermia, reportó una tasa de fertilización de 76.4% después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados por prueba hipoosmótica y 95.2% de división celular. En un caso, todos los embriones se criopreservaron para evitar el síndrome de hiperestimulación ovárica, y en los otros dos casos se transfirieron; en uno de ellos se logró el embarazo.¹² Sallam y colaboradores, en 2001, obtuvieron una tasa de fertilización con espermatozoides con prueba hipoosmótica provenientes de testículo de

37.3%.¹³ Buckett, en 2003, demostró que la prueba hipoosmótica realmente puede identificar espermatozoides no móviles viables con un valor de predicción de 80% en muestras de semen con astenozoospermia, severa o completa.¹⁴

Recientemente, Peeraer y su grupo y Gerber y colaboradores^{15,16} reportaron casos de embarazo después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides con prueba hipoosmótica en un varón con síndrome de Kartagener y astenozoospermia completa. La prueba hipoosmótica es una buena alternativa para identificar espermatozoides viables, y cuando se asocia con la inyección intracitoplasmática de espermatozoides puede ser una herramienta valiosa para incrementar las tasas de fertilización y embarazo en varones con este problema.

CONCLUSIONES

El éxito de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides combinada con la prueba hipoosmótica en un paciente con astenozoospermia total corrobora los resultados reportados en la bibliografía para la identificación de espermatozoides viables. Esta prueba puede utilizarse como un método simple para obtener fertilización y embarazo en las parejas de los pacientes con espermatozoides inmóviles.

REFERENCIAS

1. Mason A, Gibbons W, Oehninger S, Morshed M, et al. Optimizing use of assisted reproduction. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:327-332.
2. American Society for Reproductive Medicine. Evaluation of the azoospermic male. *Fertil Steril* 2008;90:S74-S77.
3. Boudaya M, Fredj SH, Haj RB, Khrouf M, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations and polymorphisms associated with congenital bilateral absence of vas deferens in a restricted group of patients from North Africa. *Ann Hum Biol* 2012;39:76-79.
4. Orozco L, Chávez M, Saldaña Y, Velázquez R, et al. Fibrosis quística: la frontera del conocimiento molecular y sus aplicaciones clínicas. *Rev Invest Clin* 2006;58:139-152.
5. Guízar-Vázquez J. Genética clínica. 3^a ed. México: El Manual Moderno, 1991;985.
6. Palermo G, Joris H, Devorey P, van Steirteghem AC. Pregnancies after intracitoplasmatic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-18.
7. Catt J, Ryan J, Pike L, O'Neill C. Fertilization rates using intracitoplasmatic sperm injection are greater than subzonal

insemination but are dependent ton prior treatment on sperm. *Fertil Steril* 1995;64:764-769.

- 8. Nijs M, Vanderzwalmen P, Vandamme B. Fertilizing ability of immotile spermatozoa after intracitoplasmatic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;100:2180-2185.
- 9. Nagy ZP, Verhyen G, Tournaye H. Special applications on intracitoplasmatic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. *Hum Reprod* 1998;13:143-154.
- 10. Shulman A, Feldman B, Madgar I. *In vitro* fertilization treatment for severe male factor: the fertilization potential of immotile spermatozoa obtained by testicular extraction. *Hum Reprod* 1999;14:749-752.
- 11. Casper RF, Meriano JS, Jarvi KA, Cowan L, Lucato ML. The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracitoplasmatic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril* 1996;65:972-976.
- 12. Lui J, Tsai Y, Katz E, Compton G, et al. High fertilization rate obtained after intracitoplasmatic sperm injection with 100% nonmotile spermatozoa selected by using a simple modified hypo-osmotic swelling test. *Fertil Steril* 1997;68:373-375.
- 13. Sallam H, Farrag A, Agameya A. The use of the hypo-osmotic swelling test for the selection of viable ejaculated and testicular immotile spermatozoa in ICSI. *Hum Reprod* 2001;16:272-276.
- 14. Buckett WM. Predictive value of hypo-osmotic swelling test to identify viable non-motile sperm. *Asian J Androl* 2003;5:209-212.
- 15. Peeraer K, Nijs M, Raick D, Ombelet W. Pregnancy after ICSI with ejaculated immotile spermatozoa from a patient with immotile cilia syndrome: a case report and review of the literature. *RBM On Line* 2004;9(6):659-663.
- 16. Geber S, Lemgruber M, Taitson PF, Valle M, Sampaio M. Birth of healthy twins after intracytoplasmic sperm injection using ejaculated immotile spermatozoa from a patient with Kartagener's syndrome. *Andrologia* 2012;44(Suppl 1):842-844.