

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES PUERTA DE HIERRO  
INSTITUTO DE CIENCIAS EN REPRODUCCIÓN HUMANA “VIDA”**



**“RESULTADOS DE ICSI CON ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS EN  
AZOOSPERMIA OBSTRUCTIVA Vs NO OBSTRUCTIVA”**

**Tesis para obtener diploma en el Posgrado de:**

**BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

Presenta:

**DR. NORMAN GUSTAVO MORALES ALVARADO**

---

**Dr. Efraín Pérez Peña**  
Asesor Académico

---

**Dr. Juan Francisco Lizárraga**  
Asesor Operacional

**Guadalajara, Jalisco, México, 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

A Dios por darme la oportunidad de haber llegado a este momento de mi vida y lo que está por venir.

Por darme distinciones que nadie más tendrá.....

Ser hijo de MIS padres Norman Morales Rodríguez y Judith Thelma Alvarado, mis maestros en esta aventura que se llama vida, de quienes sigo aprendiendo cada día, quienes siempre han tenido el amor, la dedicación y el tiempo al cuidado de mi vida, por ser, mediante su ejemplo, mi principal fuente de inspiración y deseo de superación.

Ser hermano de Christopher y Jorge, con quienes comparto tantos lindos momentos, por ser mis cómplices en la infancia y siempre demostrarme su apoyo incondicional tanto en las buenas como en las malas.

Ser esposo de una mujer increíble, Karen Orellana, quien me ha acompañado en esta nueva etapa de mi vida (no sé qué hubiese sido de mi sin ti a mi lado), mi mano derecha y fuente de fortaleza en los momentos difíciles. Por amarme como soy, por siempre creer en mí y porque pronto me darás una gran bendición, la de ser papá.

A mis amigos, en mi país, por estar siempre presentes a pesar de la distancia, y a mis amigos en México por su apoyo en todo momento, por enseñarme que la amistad no tiene banderas ni fronteras.

A mi asesor de tesis, el doctor Juan Francisco Lizárraga Salas, por su tiempo y dedicación con este proyecto, por ser un gran médico y maestro.

A mis profesores por compartirme sus conocimientos y experiencias.

# ÍNDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
1. ÍNDICE	3
2. INTRODUCCIÓN	5
3. ANTECEDENTES	8
4. MARCO TEÓRICO	12
4.1 Azoospermia	12
4.1.1 Epidemiología	14
4.1.2 Clasificación	15
4.1.3 Diagnóstico	16
4.1.4 Estudio histológico	18
4.1.5 Tratamiento	20
4.1.6 Complicaciones	25
4.2 ICSI	26
4.2.1 Técnica	27
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
6. JUSTIFICACIÓN	38
7. OBJETIVOS	41
8. HIPÓTESIS	42
9. MATERIAL Y MÉTODOS	43
9.1 Tipo de estudio	43
9.2 Universo de estudio	43

9.3 Criterios de selección	43
9.3.1 Criterios de inclusión	43
9.3.2 Criterios de exclusión	44
9.3.3 Criterios de no inclusión	44
9.4 Sede del estudio	44
9.5 Definición de variables	45
9.5.1 Variable independiente	45
9.5.2 Variables dependientes	45
9.5.3 Variables intervinientes	46
9.6 Operacionalización de variables	46
9.7 Tamaño de muestra	47
9.8 Recolección de información	47
9.9 Método estadístico	47
9.10 Consideraciones éticas	48
9.11 Recursos	48
9.11.1 Recursos humanos	48
9.11.2 Materiales	49
9.11.3 Financiamiento	49
10. RESULTADOS	50
11. DISCUSIÓN	55
12. CONCLUSIONES	58
13. BIBLIOGRAFÍA	60
14. ANEXOS	66

## 2. INTRODUCCIÓN

La inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) utilizando espermatozoos recuperados directamente del testículo ha sido comúnmente aplicada en pacientes con azoospermia obstructiva (AO) con espermatogénesis normal y azoospermia no obstructiva o secretora (AS) con falla testicular.

La recuperación espermática testicular fue introducida por primera vez en el año de 1993 y ha sido usada desde entonces en pacientes con AO y AS (1,2).

Aunque algunos estudios han demostrado bajas tasas de implantación en etapa de blastocisto utilizando espermatozoides de hombres con AS (1,3). Por otra parte, estudios han demostrado resultados exitosos utilizando espermatozoides testiculares recuperados de hombres con todos los tipos de azoospermia, resultando tan efectivos como los espermatozoides eyaculados con ciclos de ICSI (1, 4,5).

La recuperación de los espermatozoides testiculares puede obtenerse mediante aspiración directa del testículo (TESA) o mediante una incisión del mismo. (TESE). Además pueden recuperarse de epidídimo mediante aspiración epididimal percutánea (PESA) o microquirúrgica (MESA). La recuperación puede realizarse durante o en el día previo a la captura ovular, con la intención de utilizar los espermatozoides en fresco, es decir sin criopreservación. Ésta se reserva, antes de un ciclo de estimulación y aspiración ovular, para casos donde no se tiene la certeza de

obtener espermatozoides, lo cual evita iniciar un ciclo sin la seguridad de obtener espermatozoides del esposo. Éstos, cuando se recuperan, se criopreservan para utilización posterior (1, 6). Esto puede evitarse si la pareja acepta el empleo de espermatozoides de donador, si no se obtienen espermatozoides en la TESE de su esposo.

La criopreservación de espermatozoides del epidídimo y/o testicular para su uso posterior fue descrito por primera vez por *Oates et al.* (1,7). Este abordaje previene el riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) así como el costo innecesario de estimulación ovárica controlada (EOC). Tasas de embarazo (TE) similares fueron obtenidas al usar espermatozoides testiculares congelados para ICSI en estudios de *Keupker et al.* Y *Wu et al.* (1, 9).

Han existido diferentes resultados respecto a las tasas de fertilización utilizando los espermatozoides criopreservados en AS, algunos, (1,7, 10) que comparan el efecto de la criopreservación por etiología de infertilidad encontraron tasas de fertilización y de embarazo similares en espermatozoides testiculares de hombres con AS.

En pacientes con AS las mejores tasas de recuperación espermática se han obtenido mediante TESE con micro disección, y mulltiTESE (1).

Los espermatozoides pueden obtenerse por aspiración espermática epididimal percutánea (PESA) o por aspiración espermática epididimal microquirúrgica (MESA) en casos de azoospermia debidos a ausencia bilateral congénita de conductos

deferentes (CBAVD), vasoepididimostomía fallida, u obstrucción irreparable (11). Los espermatozoides también pueden ser recolectados directamente de los testículos si el epidídimo es inaccesible o si no hay espermatozoides móviles en el epidídimo (11).

Tomando en cuenta todo lo anterior, se puede concluir que no solo el origen, testículo o epidídimo, sino también el tipo de espermatozoides usados (normal/anormal; móviles, inmóviles) y el posible efecto negativo de la criopreservación, lo que pueden influenciar el resultado de ICSI. Aunque la madurez de la cromatina del espermatozoide de epidídimo es muy parecida al espermatozoide del eyaculado, dicho espermatozoide está en riesgo de daño al ADN debido a la influencia negativa de especies radicales de oxígeno en el epidídimo obstruido (11,12).



### 3. ANTECEDENTES

Los primeros intentos para inseminar ovocitos se hicieron mediante el uso de espermatozoides eyaculados utilizando fertilización in vitro (FIV).

La mejoría progresiva en cuanto a la manipulación de esperma de pobre calidad permitió la fertilización con espermatozoides de pacientes oligozoospermicos. Estos esfuerzos culminaron en técnicas de micro inseminación, disección parcial de zona (PZD), inseminación subzonal (SUZI), y de manera reciente la inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Esta última técnica permitió la posibilidad de tratar a pacientes azoospermicos, mediante el uso de espermatozoides recuperados de los conductos deferentes, epidídimo y los testículos (13).

El primer reporte exitoso de recuperación espermática del epidídimo fue reportado por Temple- Smith y colaboradores y fue acuñado “Aspiración Espermática Epididimal microquirúrgica” o MESA (13).

En 1993, Schoysman inició la recuperación espermática testicular, al buscar espermatozoides mediante MESA y no encontrar en diferentes niveles obstruidos de un epidídimo (14,15). Este primer intento de usar espermatozoides testiculares para inseminar ovocitos usando ICSI fue exitoso y promovió el uso de extracción espermática testicular (TESE) o aspiración (TESA).

En general, TESE con micro disección se considera el mejor método con más altas tasas de recuperación espermática con mínima pérdida de tejido en pacientes azoospermicos.

Los resultados de la ICSI son similares o levemente mejores que los de la FIV, por lo cual en algunos centros se ha intentado sin justificación sustituir la FIV por ICSI.

La verdadera ventaja del procedimiento es que ofrece buenos resultados en casos donde la FIV fracasa, como en alteraciones espermáticas severas o falla de fertilización (16).

Respecto al uso de espermias frescos vs congelados e ICSI, algunos embriólogos tienen la idea de que usar los segundos tiene mayor probabilidad de falla por mayor tasa de abortos. Un estudio comparativo de pacientes con espermias de epidídimo (obstructivos) vs testiculares (secretora) se identificó que las tasas de aborto en el segundo grupo fueron de 41% Vs 11.1% en el de espermias de epidídimo (OA). **(TABLA 1)** (17). Un meta-análisis reciente tomando en cuenta la criopreservación en ambos tipos de azoospermia muestra que cuando se comparan las tasas de aborto en pacientes con AS, al utilizar espermias frescos dicha tasa fue de 6.8% vs 10% en criopreservados. Por otra parte en la AO con espermias frescos la tasa de aborto es de 8.6% contra 7.6% en criopreservados, sin diferencia estadística significativa **(TABLA 2)** (18).

**TABLA 1. Resultados de ICSI con espermias de epidídimo (PESA) y testículo (TESA) en ambos tipos de azoospermia**

Variables	PESA	PESA + TESA	TESA	Valor p
Edad Promedio	31.4	32.7	30.8	Entre 3 grupos > 0.05
% Fert Normal (2 PN)	58.7	62.3	57.3	
% Fert Anormal (1 + 3 PN)	21.4	10.4	14.5	
% Transfer Embrionaria	73.6	78	73.4	
% embarazo/ciclo	34.6	37.5 *	26.1	Vs otros 2 grupos < 0.05
% embarazo/ transferencia	40	37.5 *	28.3	
% embarazo/ paciente	54.5	37.5 *	31	
% aborto	11.1	33 *	41	

**\*Versus PESA p > 0.05**

Pasqualotto, Borges et al., J Urol 2002; 167: 1753-56

**TABLA 2. Resultados de ICSI y Transferencia de Embriones con recuperación espermática el día de la recuperación de los oocitos (A), el día antes (B) y con espermias congelados (C)**

Variable	Grupo A			Grupo B			Grupo C		
	Total	AO	AS	Total	AO	AS	Total	AO	AS
<b>No. Ciclos</b>	166	67	99	42	16	26	129	45	84
<b>No. Oocitos Recolectados</b>	10.8	9.7	11.2	10.1	9.8	10.3	9.8	8.8	10.3
<b>No. Oocitos inyectados</b>	7.8	8.2	9.4	7.1	8.1	8.3	8.3	7.4	8.4
<b>Tasa Fertilización (%)</b>	70.7	76.2	67.2	68.7	71.9	65.9	67.3	68.9	64.7
<b>No. Embriones transferidos</b>	2.1	2.3	1.9	2.2	2.3	2.1	2.3	2.2	2.1
<b>Tasa de implantación (%)</b>	13.4	14.2	12.6	16.5	16.6	16.4	12.8	13.3	12.3
<b>Embarazos Clínicos por ciclo, n (%)</b>	52 (31.3)	23 (34.3)	29 (29.9)	13 (30.9)	5 (31.2)	8 (30.7)	33 (25.5)	13 (28.8)	20 (23.8)
<b>No. De abortos (%)</b>	4(7.6)	2(8.6)	2(6.8)	1(7.6)	0	1 (12.5)	3(9)	1(7.6)	2(10)
<b>Tasa de Nacidos Vivos (%)</b>	48 (28.9)	21 (31.3)	27 (27.2)	12 (28.5)	5 (31.2)	7 (26.9)	30 (23.2)	12 (26.6)	18 (21.4)

FERTIL STERIL VOL. 100 NO. 4 / OCTOBER 2013

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Azoospermia

La inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) utilizando espermatozoos testiculares ha sido comúnmente aplicada en el tratamiento de AO con espermatogénesis normal y AS con falla testicular.

El primer reporte exitoso de recuperación espermática del epidídimo fue reportado por Temple- Smith y colaboradores y fue acuñado “Aspiración Espermática Epididimal microquirúrgica” o MESA (13).

En 1993, Schoysman inició la recuperación espermática testicular y ha sido usada desde entonces en pacientes con AO y AS (1,2, 14,15). Aunque algunos estudios han demostrado bajas tasas en etapa de blastocisto y menores tasas de implantación con espermatozoides de hombres con AS (1,3), los espermatozoos testiculares recuperados de hombres con todos los tipos de azoospermia fueron tan efectivos como los espermatozoides eyaculados con ciclos de ICSI (1, 4,5).

Los espermatozoides obtenidos en pacientes azoospermicos son aspirados del epidídimo o extraídos directamente del testículo. La extracción de espermatozoides testiculares (TESE) puede ser realizada el día de la captura ovular o el día previo, y ser utilizados en fresco, o varios días antes de iniciar la estimulación ovárica con lo

que se logra la certeza de encontrar espermatozoides o no, y conocer la calidad de los mismos, con lo cual se reduce de forma importante el estrés en la pareja (1, 6).

La criopreservación de espermatozoides del epidídimo y/o testicular para su uso posterior fue descrito por primera vez por Oates *et al.* (1,7). A este respecto ha existido controversia sobre el potencial fértil de los espermatozoides que fueron criopreservados contra los usados en fresco, algunos estudios favoreciendo las tasas de éxito con espermatozoides frescos. Otros autores han reportado tasas similares de embarazo al usar espermatozoides testiculares congelados para ICSI (1, 9).

Respecto a las técnicas de recuperación espermática, en pacientes con AS se han comparado microTESE y multiTESE, en la primera se realiza una microdissección del tejido con resección sólo de los túbulos más opacos, en la segunda, sin utilizar microcirugía se realizan múltiples incisiones testiculares buscando zonas de espermatogénesis normal. La microdissección se considera un excelente método con altas tasas de recuperación espermática y mínima pérdida de tejido en pacientes con falla testicular, sin embargo requiere experiencia en microcirugía y los costos son mayores que en multiTESE, que también resulta un excelente método con tasas de recuperación espermática comparables a microTESE (**TABLA 3**) (19).

TABLA 3. Comparación entre Hallazgos Histopatológicos y Recuperación Espermática entre MicroTESE y TESE				
	Múltiple (Tiempo Quirúrgico 68.2 min)		Microdissección (Tiempo Quirúrgico 146.8 min)	
	Casos (%)	Espermas (%)	Casos (%)	Espermas (%)
<b>S. Solo Sertoli</b>	23 (62.2)	13	40 (71.4)	22.5
<b>Detención Maduración</b>	1 (2.7)	0	4 (7.1)	75
<b>Hipoespermia</b>	13 (35.1)	76.9	12 (21.4)	100
<b>TOTAL</b>	37 (100)	35.1	56 (100)	42.9

Human Reproduction Vol.17, No.11 pp. 2924–2929, 2002

Entre las variables del varón que pueden modificar el resultado de ICSI en azoospermia se han estudiado: El sitio de extracción del esperma; el uso de espermias frescos o criopreservados; la motilidad y la morfología de los espermias obtenidos (11,12).

#### **4.1.1. Epidemiología**

La prevalencia de todos los tipos de azoospermia, obstructiva o secretora, definida como ausencia completa de esperma en el eyaculado, es menor al 1% entre todos los hombres y aproximadamente del 10% al 15% entre los hombres infértiles (4).

Aunque la azoospermia tiene muchas causas, aproximadamente 40 % de los casos resultan de la obstrucción del sistema ductal (20). La azoospermia obstructiva es más común posterior a vasectomía, pero también puede originarse por patología de los conductos eyaculadores, epididimales o de los deferentes, causadas por infección genitourinaria, lesiones iatrogénicas durante procedimientos quirúrgicos inguinales o escrotales y anomalías congénitas (20).

Las anomalías cromosómicas se observan en aproximadamente 7 % de los hombres infértiles. La frecuencia de estas anomalías es inversamente proporcional al conteo espermático, con una prevalencia de 10-15 % en hombres con azoospermia no obstructiva, 5 % en oligospermicos y < 1 % en normozoospermicos. El síndrome de Klinefelter abarca aproximadamente dos terceras partes de las anomalías cromosómicas observadas en hombres infértiles. Las microdeleciones del cromosoma Y se encuentran en 10-15 % de los hombres azoospermicos o con oligospermia severa, y se detectan mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR). (21)

#### ***4.1.2 Clasificación de azoospermia***

La mayoría de los casos de azoospermia derivan de una causa obstructiva en cualquier nivel desde los conductos eferentes a los conductos eyaculatorios (17,22), estos pacientes cursan con espermatogénesis normal, volumen testicular normal, y niveles séricos normales de hormona folículo estimulante (FSH). Causas comunes de AO incluyen vasectomía previa, ausencia congénita de los conductos deferentes, epididimitis post infecciosa, y causas más raras como síndrome de Young, trauma testicular, y eyaculación retrograda. En este grupo de pacientes la extracción espermática es exitosa en casi el 100% de los casos (20).

En los pacientes con AS esta puede ser causada por enfermedad que es intrínseca a los testículos, falla testicular primaria, o secundaria a otras condiciones como



andrógenos exógenos, calor, gonadotoxinas, que también pueden generar falla gonadal. Otras anomalías, de tipo endócrino, como los hipogonadismos, pueden suprimir la espermatogénesis por falta de estímulo hormonal al testículo, también denominada falla testicular secundaria. Clínicamente, suelen tener disminución de volumen testicular y niveles aumentados de FSH, aunque existen casos de falla testicular que conservan su volumen y niveles hormonales, tales como la detención en la maduración espermática. Las causas más comunes de AS incluyen síndrome de Klinefelter, iatrogenia (radioterapia), torsión, orquitis, y criptorquidia (17).

La extracción espermática en este grupo es efectiva en aproximadamente 50% de los casos y correlaciona con el patrón histológico de la biopsia testicular (4). Se ha asociado a una menor tasa de recuperación el Síndrome de Solo Células de Sertoli. Los niveles elevados de FSH aumentan las probabilidades de no encontrar espermatozoides en la biopsia testicular, sin embargo aún con elevación de de 3X del valor normal de FSH se han recuperado espermatozoides.

#### **4.1.3. Diagnóstico**

El análisis del semen debe ser realizado de acuerdo a los parámetros de la Organización Mundial de la Salud Ed 5(17,23). La ausencia de espermatozoides en el análisis microscópico estándar de semen debe ser confirmado mediante la centrifugación del semen a 3000g por 15 minutos con examinación microscópica meticulosa de alto poder (X 400) del sedimento. La preparación extendida del semen de una muestra centrifugada detecta espermatozoides en hasta 35% de los hombres

que tienen azoospermia no obstructiva (17,24). Se examinan 2 muestras de semen en un intervalo de 4 semanas de esta manera. La eyaculación retrógrada debe ser considerada en hombres con un volumen de eyaculado menor de 1.0 mL, especialmente en diabéticos y bajo el efecto de fármacos como alfa bloqueadores. Su evaluación es mediante una muestra de orina post eyaculado (17,24).

Una vez que se ha diagnosticado azoospermia, debe determinarse si es o no obstructiva. La historia médica exhaustiva y el examen físico son los pasos iniciales para evaluar un paciente azoospermico. Antecedentes como historia de infertilidad en familiares directos por rama paterna, orquitis, exposición a gonadotóxicos, fármacos, cirugías escrotales, inguinal, y por supuesto de vasectomía son de especial importancia. La valoración hormonal debe incluir medición de FSH, LH, prolactina, testosterona total y estradiol. La distinción entre AO y AS puede basarse en los hallazgos clínicos (17).

Cuando los niveles de FSH son  $\leq 7.6$  mIU/mL y el eje testicular mayor es superior a 4.6 cm, 96% de los casos son AO. Por otra parte, cuando los niveles de FSH son mayores a 7.6 mIU/mL y el eje testicular mayor  $\leq$  a 4.6 cm, en el 89% se encuentra azoospermia no obstructiva (secretora) (17,25).

#### **4.1.4. Estudio Histológico Testicular**

En cada procedimiento quirúrgico de biopsia testicular, ya sea TESE o micro TESE, un fragmento de parénquima subcapsular (5 × 3 × 2 mm) se remueve luego de incidir la túnica albugínea.

Las muestras de tejido se colocan en un tubo con medio de cultivo HTF Hepes + 10 % suplemento de suero sintético (SSS) y se envían al laboratorio.

Una vez en el laboratorio se colocan los fragmentos de tejido en cajas de Petri pequeñas con medio HTF hepes + 10% SSS, se dilaceran con ayuda de navajas de bisturí para romper los túbulos seminíferos y así facilitar la liberación de espermatozoides. La muestra de aspiración del epidídimo se homogeniza perfectamente. Se coloca una pequeña cantidad de la suspensión en un portaobjetos para ser observado al microscopio invertido a 200 ó 400 aumentos (26).

Al confirmar la presencia de espermatozoides, es necesario revisar de 2 a 3 muestras para determinar concentración aproximada y calidad espermática.

Si no se encuentran espermatozoides, se revisan varias muestras y se informa inmediatamente al médico para que proceda a tomar más tejido del mismo testículo o realizar la biopsia del otro testículo. Así como, realizar la aspiración del otro epidídimo (26).

Los espermatozoides recuperados se congelan mediante aspiración con una pipeta estéril con los espermatozoides y depósito en un tubo cónico de preparación de semen que se centrifuga a 600 g por 5 minutos para lavado, se elimina el

sobrenadante y el sedimento con los espermatozoides y se resuspende en 1 ó 2 ml de medio limpio según el número de viales que se planea congelar, se añade gota a gota la solución crioprotectora (Freezing médium de Irvin Scientific) en proporción 1:1 con respecto al volumen de la muestra, agitando constantemente para facilitar la incorporación homogénea del crioprotector. A partir de que caiga la última gota del crioprotector, se cronometran 10 minutos y se deja la muestra a temperatura ambiente. De aquí en adelante se sigue el mismo procedimiento de la congelación de semen (26).

En azoospermias obstruivas, los espermatozoides de testículo se cultivan en atmósfera de CO<sub>2</sub> a 37°C por 48 horas antes de congelarse siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Lavar la muestra, eliminar el sobrenadante y resuspender en 3.2 ml de medio limpio el sedimento con los espermatozoides.
2. Homogenizar y distribuir la suspensión en alícuotas de 800:1 por pocillo en una caja de 4 pocillos.

En azoospermias secretoras y aspiración de epidídimo se procede a la congelación inmediata (26).

Luego se fija en solución de Bouin y se envía al patólogo. El análisis histopatológico se realiza mediante el estudio de 100 diferentes secciones de los túbulos seminíferos. Los resultados histológicos se definen como: (I) Síndrome completo de solo células de Sertoli (cSCOS) donde los túbulos están poblados solo por células de

Sertoli; (II) SCOS incompleto (iSCOS) donde las células germinales están presentes en pocos túbulos; mientras la mayoría muestran solo células de Sertoli; (III) Detención de maduración (MA) caracterizado por una detención de la secuencia de maduración espermática; e (IV) hipoespermatogenesis en el cual los túbulos muestran una población severamente disminuida de células germinales y pobre espermatogénesis (27,28).

#### **4.1.5. Tratamiento**

##### **A. Opciones de Tratamiento para Azoospermia No Obstructiva**

La recuperación quirúrgica de espermatozoides para su uso con ICSI es una excelente técnica y brinda la posibilidad de tener un hijo en pacientes con AS. Especialmente en aquellos en quienes el tratamiento médico no fue una opción. Una reciente revisión de literatura científica muestra tasas de recuperación aceptables obtenidas mediante extracción espermática testicular única (TESE) (49.5%; *Donoso et al.*, 2007), TESE múltiple (52.5%; *Colpi et al.*, 2005), y TESE microquirúrgica (micro TESE) (47–64%; *Colpi et al.*, 2005; *El-Hagggar et al.*, 2007; *Talas et al.*, 2007). Inversamente, la técnica mediante aspiración testicular con aguja fina es por mucho la menos eficaz (10.0%; *El-Hagggar et al.*, 2007) y prácticamente descartada por los lineamientos de la Asociación Europea de Urología (*Dohle et al.*, 2007) (28).

En un estudio comparativo de las dos técnicas más exitosas para recuperar espermatozoides en este grupo de pacientes, se identifica que los pacientes sometidos a

microTESE logran una recuperación de espermatozoides del 42.9% contra 35.1% en multiTESE. La principal ventaja de microTESE parece ser en los pacientes con S. Sólo Células de Sertoli (SSCS) donde se logra una recuperación de espermatozoides del 22.5% contra 13 % en multiTESE (19).

La técnica de micro TESE parece ser recomendable especialmente en casos de concentraciones elevadas de FSH. Desafortunadamente, no existen elementos pronósticos preoperatorios seguros para la recuperación de espermatozoides en pacientes con AS, ya que ni la orquidometría y/o la concentración de FSH sérico son predictivos (28).

### ***B. Opciones de Tratamiento para Azoospermia Obstructiva***

Los hombres con azoospermia obstructiva se tratan de dos formas: corrección quirúrgica de la obstrucción, la cual permite a la pareja concebir de manera natural, o extracción directa de los espermatozoides del epidídimo o los testículos, seguido de FIV o ICSI (20).

### ***C. Tratamiento Quirúrgico en Azoospermia Obstructiva***

El tratamiento quirúrgico varía de acuerdo al sitio de la obstrucción. Las obstrucciones en los vasos deferentes y el epidídimo son tratadas con reconstrucción microquirúrgica (20). Los resultados de vaso-vaso anastomosis varían de acuerdo al tiempo post-vasectomía. Según *Belker et al.* si se realiza en un tiempo < 3 años post-

vasectomía se obtiene una tasa de embarazo de 76 %, entre 3-8 años es de 53 %, entre 9-14 años es de 44 % y si es  $\geq 15$  años la tasa de embarazo disminuye hasta 30 %.

#### ***D. Técnicas para Recuperación Espermática e ICSI***

La aspiración microquirúrgica de espermatozoides del epidídimo (MESA) se utiliza para aspirar espermatozoides del epidídimo en casos de CBAVD, obstrucción irreconstruible del tracto reproductivo, o en casos donde el paciente opta porque no se le realice reconstrucción quirúrgica (29).

Para evitar la contaminación de los espermatozoides con sangre durante la aspiración, se desarrolló la técnica de micropunción de túbulos epididimarios (30).

Estos se identifican mediante el microscopio quirúrgico y se aspiran de manera individual con técnica atraumática. Se realizan micropunciones secuenciales hasta obtener una calidad óptima de espermatozoides. Los sitios de punción pueden ser cerrados o cauterizados (30). Una técnica alternativa es incidir los túbulos y recolectar el fluido luego de que salga de los túbulos. Solo se necesita obtener microlitros de fluido, ya que los espermatozoides están altamente concentrados. De esta manera, MESA provee números más que adecuados de espermatozoides para su uso inmediato, así como su criopreservación (29).

La aspiración de los epidídimos también puede ser realizada sin exploración quirúrgica escrotal, fácilmente y a bajo costo, y no requiere un microscopio

quirúrgico o ser experto en microcirugía. La aspiración de epidídimo percutánea de espermatozoides (PESA) se realiza con anestesia local o general. Luego de la aplicación de anestesia, el testículo se estabiliza y el epidídimo se sostiene entre los dedos índice y pulgar del cirujano. Luego se coloca una aguja de mariposa a una jeringa de 20 ml la cual se inserta en el epidídimo y se retira gentilmente hasta que el fluido se puede ver entrando al tubo del set de aspiración. El procedimiento se repite hasta obtener una adecuada cantidad de fluido espermático. Si no se recuperan espermatozoides, entonces se recomienda realizar MESA, biopsia testicular o aspiración testicular (29).

Entre las técnicas de recuperación espermática del testículo, está la biopsia testicular abierta que se aplica mejor a hombres con azoospermia no obstructiva. Su principal riesgo es lesionar las arterias testiculares y causar infarto testicular parcial. La biopsia microscópica abierta permite recuperar espermatozoides sin dañar las arterias (29).

La técnica de aspiración percutánea con aguja fina (FNA) del testículo fue inicialmente descrita como un procedimiento diagnóstico en hombres azoospermicos, actualmente se usa para recuperar espermatozoides para técnicas de reproducción asistida. A este procedimiento también se le llama aspiración espermática testicular (TESA). En este procedimiento, el testículo se sostiene entre el dedo pulgar e índice del cirujano y la aguja se inserta en el eje mayor del testículo. La aguja se retira lentamente y se redirecciona para romper la arquitectura testicular. Este procedimiento se repite hasta obtener tejido testicular adecuado.



La biopsia testicular percutánea se realiza con instrumental para biopsia número 14 con una extensión corta (1 cm) que se usa para recuperar el tejido testicular. La anestesia se aplica mediante bloqueo del cordón espermático, y se pueden obtener múltiples biopsias a través de un sitio único de entrada. El núcleo de la aguja provee mejor recuperación de espermatozoides (29).

Otros métodos que se usan con menor frecuencia incluyen aspiración espermática de vasos deferentes y aspiración espermática de vesícula seminal guiado por ultrasonido transrectal. La elección del método depende primordialmente de la experiencia y preferencia del cirujano y los embriólogos involucrados en el cuidado del paciente (30).

La técnica de recuperación espermática y el origen del esperma (testículos, epidídimo, vasos deferentes o vesícula seminal) no tienen efecto significativo en las tasas de embarazo logradas mediante FIV/ICSI (31).

Todos los métodos proveen suficiente número de espermatozoides viables para ICSI y casi siempre para criopreservación. Siempre y cuando se recuperen espermatozoides viables, ni la duración de la obstrucción ni la movilidad de los espermatozoides afecta los resultados de FIV/ICSI (20, 31, 32). Buffat sugiere que los espermias testiculares aún en espermatogénesis normal alteran el desarrollo embrionario y deben usarse preferentemente epididimarios. En contraste Ramos reporta que al usar espermias morfológicamente normales y motiles no hay mayor evidencia de daño al DNA que con eyaculados (20)

La recuperación espermática se realiza antes o el mismo día de la captura ovular en la mujer. Aunque muchos laboratorios prefieren utilizar espermatozoides de testículo o epidídimo en fresco en lugar de criopreservado, no hay evidencia sustancial que indique que los espermatozoides frescos den mejores resultados. Por razones lógicas y financieras, es preferible o más práctico el criopreservar esperma mucho antes de la captura ovular. El lapso entre la crio preservación y FIV/ICSI no afecta las tasas de fertilización o las tasas de embarazo (20).

#### **4.1.6. Complicaciones**

Las complicaciones post operatorias de la extracción espermática son raras y menores, incluyen dolor persistente, irritación, infección y hematoma. Evidencia ultrasonográfica de daño tisular puede ser observada poco tiempo después de la extracción testicular espermática, pero los cambios son transitorios. Para permitir una adecuada recuperación y restablecimiento de la espermatogénesis, el lapso mínimo entre procedimientos es de 3 a 6 meses. Luego de la vasectomía, cambios histológicos testiculares como fibrosis y disminución en el número de espermátides ocurren, éstos empeoran con mayor tiempo de obstrucción; las tasas de embarazo disminuyen también. No hay estudios que demuestren mayor riesgo de malformaciones en recién nacidos cuando se realiza ICSI con espermatozoides extraídos de hombres con azoospermia obstructiva (33).

Todas las parejas a quienes se les realizará ICSI deben estar informadas de los riesgos potenciales, que incluyen síndrome de hiperestimulación ovárica, complicaciones en la captura ovular, y los peligros y consecuencias de un embarazo múltiple, el cual se asocia a mayor morbilidad y mortalidad infantil, relacionados con la gestación pre-término. En los Estados Unidos de América (EUA), aproximadamente 15.5% a 32.3% de los embarazos logrados mediante ICSI son gemelares y 0.6% a 2.0% son trillizos o embarazos múltiples; con tasas más altas entre las mujeres menores de 35 años (33).

#### ***4.2. Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)***

En casi todos los casos en los cuales los espermatozoides son extraídos directamente de los testículos o epidídimos de hombres con azoospermia obstructiva, la ICSI puede ser usada para lograr la fertilización porque las técnicas de extracción espermática en dichos pacientes rara vez brindan un número suficiente de espermatozoides móviles para realizar inseminación intrauterina o FIV estándar. Cuando se utilizan espermatozoides extraídos de testículos y epidídimos para ICSI, las tasas de fertilización varían entre 45% y 75% por cada ovocito inyectado; las de embarazo clínico varían desde 26% a 57%. En la mayoría de los centros de reproducción asistida, se pueden esperar tasas de embarazo clínico entre 30% y 40% (16,20).

La ICSI consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito que previamente se decumula (16,34).

### **4.2.1. Técnica**

#### A. Procedimientos de obtención y preparación de espermatozoides

En la mayoría de los casos los espermatozoides provienen de eyaculado obtenido por masturbación antes o después de la aspiración folicular. En pacientes con lesión espinal por arriba de T10 es factible obtener muestra por eyaculado con estimulación vibratoria. Ante casos de lesión nerviosa por diabetes o esclerosis múltiple, la electroeyaculación puede utilizarse para obtener la muestra, pero si el paciente conserva la sensibilidad es necesario emplear anestesia (16).

Cuando esto no es factible las dos técnicas mas utilizadas para obtención de espermatozoides son PESA y TESE. Esta última, a su vez, puede realizarse con tres tipos de variantes: abierta, percutánea y con micro disección. El tejido obtenido se dilacera bajo el microscopio en una placa de Petri con medio de cultivo (16).

#### B. Crio preservación de espermatozoides

Cuando se obtienen por PESA o TESE, los zoospermos pueden congelarse solos o con el tejido testicular de acuerdo a las posibilidades del laboratorio de gametos. Si hay muy pocos espermatozoides, estos se criopreservan mejor solos o en números pequeños en el interior de zonas pelucidas vacías humanas, de ratón o hámster antes de añadir el crio protector (16). Los resultados son similares con la utilización de ZP de diferentes especies. Las ZP vacías de hámster se pueden obtener en forma

comercial. Aunque los resultados con utilización de zoospermos en fresco son levemente superiores que con congelados y descongelados, para ICSI la diferencia no es significativa (16).

#### C. Estimulación ovárica controlada y aspiración folicular

Si hay duda respecto a la posibilidad de obtención de espermatozoides de epidídimo y testículo, es preferible efectuar la biopsia antes de la estimulación ovárica controlada (EOC) y congelar los que se encuentren. Cuando no se desee retrasar más el procedimiento ante la posibilidad anterior, hay que discutir con la pareja y obtener su consentimiento para la posible utilización de semen de donador (16).

#### D. Decumulación o denudación de las células de la granulosa de los óvulos

Esto permite no solo la inyección precisa, sino también la evaluación más correcta de la madurez ovular. Se efectúa con medios químicos y físicos mediante pipeteo (a través de diámetros de 125 a 175  $\mu\text{m}$ ) de los ovocitos en una solución con hialuronidasa con 8 a 10 UI a temperatura de 37°C. La exposición de los óvulos y la concentración de hialuronidasa deben ser limitadas para evitar activación partenogénica. Una vez denudados los ovocitos se determina normalidad, madurez y características de los mismos y luego se incuban por más de 20 minutos (16,34).

#### E. Capacitación espermática previa a la inyección

Los espermatozoides obtenidos de eyaculado se preparan de acuerdo a sus características con gradientes de densidad, con técnicas de *swim up*, o cuando las condiciones lo permiten, con ambas técnicas para seleccionar los de optima calidad. Si la muestra contiene muy pocos zoospermos, se efectúa solo un lavado de los mismos para remover las células y *detritus* del líquido seminal, con el fin de concentrar, sin disminuir, el número de ellos (16, 34).

Para espermatozoides de testículo lo más recomendable es una pequeña biopsia, de preferencia con técnica microquirúrgica.

Los aspirados de epidídimo se colectan en muestras separadas, se preparan con gradientes de densidad y se re suspenden en microgotas de medio de cultivo para distribuirse en la placa de inyección.

El tejido testicular obtenido con biopsia se dilacera con agujas bajo el microscopio para obtener los espermatozoides, los cuales luego se re suspenden en microgotas. En caso de duda de vitalidad resulta útil la prueba hiposmótica, con la cual los zoospermos vivos muestran retracción de la cola, mientras que los muertos no experimentan cambios y se desechan (16, 34).

#### F. Equipo necesario para la microinyección

A los requerimientos de un buen laboratorio de gametos y embriones hay que agregar la utilización de un micromanipulador con placas calefactoras y equipo anti

vibratorio, manipuladores manuales o automáticos con *joy stick*, o los nuevos aditamentos con rayo laser, donde el rayo laser diodo de 1.48  $\mu\text{m}$  infrarrojo se está utilizando en múltiples centros de RA; además, un microscopio invertido para disección, placas de Petri y micro pipetas de sujeción y de inyección, las cuales pueden fabricarse en el mismo centro u obtenerse en casas comerciales (16, 34).

#### G. Técnica de inyección

Para la microinyección es conveniente que el protocolo que se utilice sea seguido estrictamente y con el mismo control de calidad por todos los que realicen el procedimiento. El entrenamiento en la técnica resulta indispensable y cada vez se introducen mayores mejoras que repercuten en la optimización de resultados (16).

#### H. Preparación de la placa de ICSI

En una placa de Petri se colocan varias gotas centrales con 4-5  $\mu\text{L}$  de polivinilpirrolidona (PVP) al 10% cada una, y luego se le añade a cada una de ellas 1  $\mu\text{L}$  de la solución con los espermatozoides ya preparados. Se rodean las gotas de PVP y espermatozoides con un número variable de gotas de 4-5  $\mu\text{L}$  de medio de Flushing. Se cubren todas las gotas con aceite mineral o parafina estéril.

Una vez que está preparada la caja e inmediatamente antes de la microinyección, se colocan los ovocitos en las gotas con medio de Flushing (16,34).

## I. Selección, inmovilización y captura de los espermatozoides

Se introduce la punta de la pipeta en una gota de PVP al 10% y se aspira un pequeño volumen del medio. Por la alta viscosidad del PVP se provoca disminución de la motilidad del espermatozoide, lo cual permite un mejor control del micro inyector y facilita la inyección de una mínima cantidad del medio durante la inyección. La selección convencional de los espermatozoides se basa en la morfología y movilidad observadas a aumentos de entre 200 y 400X (16,34).

La inmovilización de cada espermatozoide seleccionado es crucial para desestabilizar la membrana plasmática y facilitar la liberación del factor citosólico del espermatozoide, paso fundamental para inducir la activación ovocitaria, la descondensación del núcleo espermático y la formación del pronúcleo masculino.

Primero, por la viscosidad de la solución, se disminuye la motilidad del espermatozoide al colocarlo en una gota de polivinilpirrolidona (PVP). Con una micro pipeta se frota con cuidado la cola contra la placa con movimientos laterales, y se provoca una fractura por debajo de la pieza intermedia para no lesionar el centriolo, indispensable para la formación del huso bipolar en la primera división meiotica.

Los espermatozoides provenientes de testículo o epidídimo, por diferencias en la permeabilidad de la membrana, requieren una inmovilización más agresiva (16, 34).



## J. Procedimiento de micro inyección

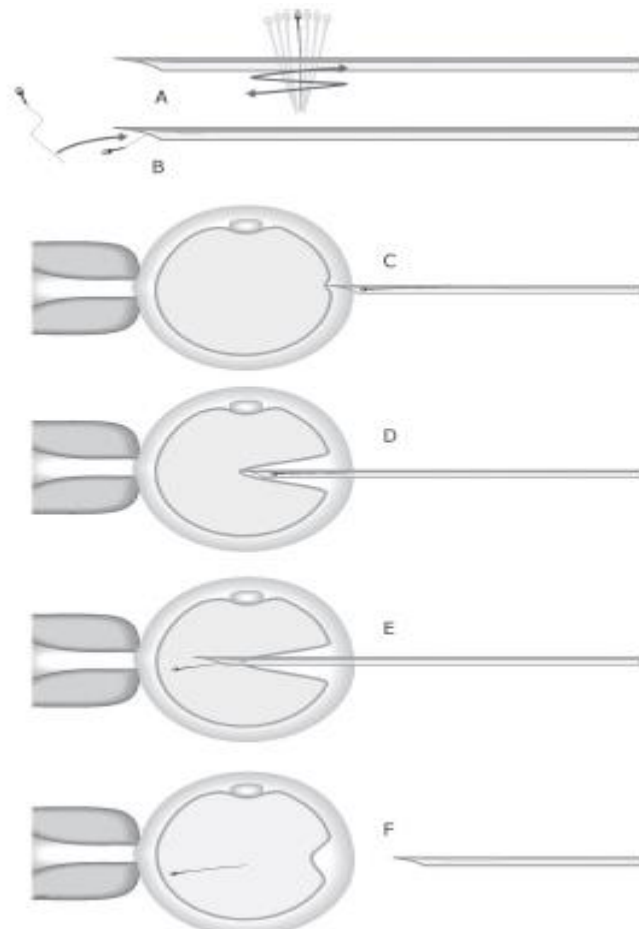
El espermatozoide inmovilizado se aspira a partir de la cola en la micro pipeta de inyección que contiene PVP.

El ovulo se fija con una pipeta de sujeción (*holding pipete*) verificando que el cuerpo polar se encuentre en la posición “6” o “12” del reloj para disminuir la probabilidad de lesionarlo. Aunque rara vez es necesario, esto también se ha logrado con la utilización en el micro manipulador de luz polarizada específicamente diseñada (*Polscope®*, *Spindle View®* *ICSI Guard®*) para la visualización del huso por birrefringencia, sin necesidad de tinción de los ovocitos (16,34).

El procedimiento se lleva a cabo en un laboratorio de reproducción asistida que reúna todos los requisitos de control de calidad, utilizando un micro manipulador con placas de calefacción, equipo de videograbación y mesa anti vibratoria. En una placa de plástico de micro inyección que contiene las microgotas cubiertas con aceite mineral, se trabaja con palancas de mando tipo *joystick*. Se mantiene permanentemente en foco la punta de la aguja micro inyectora, y en la zona ecuatorial del ovocito, alrededor de la zona “3” del reloj, se punciona la zona pelucida y la membrana plasmática del ovocito (olema) (16,34).

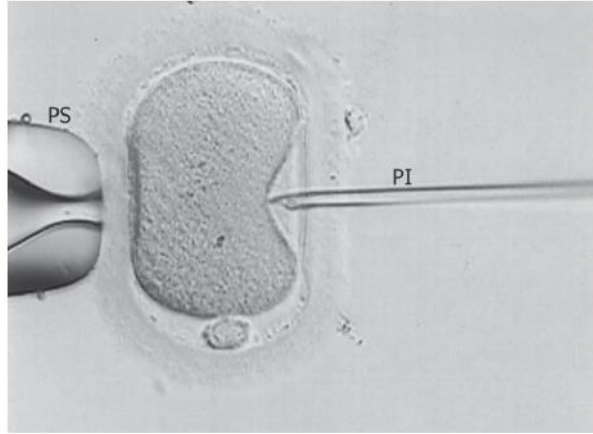
Se aspira un poco de citoplasma para confirmar la penetración y se libera el espermatozoide junto con el citoplasma aspirado (**Figura 2**). Con suavidad, se retira la micro aguja sin arrastrar con ella el espacio peri vitelino y se observa la restauración de la posición de la membrana plasmática (**Figuras 1 y 2**). A

continuación se libera el ovocito de la pipeta de sujeción y se coloca dentro de una incubadora en una caja con medio de cultivo. Se evalúa la fecundación 12-16 horas después (16,34).



Pérez Peña; Atención Integral de la Infertilidad

**Figura 1.** Técnica de ICSI. A) Inmovilización del espermatozoide con compresión leve de la cola. B) Aspiración del espermatozoide en la microaguja. C) Fijación del ovocito a la pipeta. D) Introducción de la microaguja. E) Inyección del espermatozoide en el citoplasma ovular. F) Ovocito inyectado



Pérez Peña; Atención Integral de la Infertilidad

Figura 2. Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). PS: micro pipeta de sujeción (holding); PI: micro pipeta de inyección

#### K. Incubación de oocitos microinyectados

Se lavan los oocitos microinyectados en 3 gotas de 40  $\mu$ L de medio IVF y se trasladan a gotas de 20  $\mu$ L de medio IVF en la placa de cultivo.

Estas se cubren con 3 mL de aceite mineral y se pasan a la incubadora, donde permanecen hasta la evaluación para determinar si ocurrió o no fecundación (16,34).

#### L. Evaluación de fertilización y división celular

La tasa de fecundación por oocito microinyectado es de alrededor del 80%. Aun en ICSI puede presentarse poliploidía, no por exceso en la penetración de espermatozoides, sino por la falta de extrusión y posterior activación del segundo corpúsculo polar o también por fragmentación. Ocasionalmente se observa

activación partenogenética en presencia de 1 PN, lo que se favorece con el tratamiento con hialuronidasa durante la decumulación (16).

La mayoría de las fallas de fecundación se deben a expulsión del espermatozoide en el espacio peri vitelino por perforación inadecuada de la membrana del oocito. Otros casos se deben a la inyección de espermatozoides de dudosa viabilidad, creyendo que solo les faltaba motilidad. (16, 34)

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se reconoce a la infertilidad como un problema de salud pública a nivel mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El varón es el causal en cerca del 30% de las parejas infértiles como factor único, con un 20% adicional en forma compartida.

La prevalencia de todos los tipos de azoospermia, obstructiva o secretora, definida como ausencia completa de espermatozoides en el eyaculado, es menor al 1% entre todos los hombres y aproximadamente del 10% al 15% entre los hombres infértiles.

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) en las últimas dos décadas han logrado que miles de parejas infértiles tengan hijos, así como el desarrollo de las técnicas de recuperación espermática (MESA, PESA, TESE, TESA) ahora permiten a pacientes con azoospermia, obstructiva o secretora, utilizar sus propios espermatozoides, ya sea en fresco o criopreservados, para lograr un recién nacido sano.

No hay duda de que se logran altas tasas de embarazo, tanto en azoospermia obstructiva como secretora, con espermatozoides provenientes de biopsia testicular e ICSI.

Por lo cual nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el resultado de ICSI al utilizar espermatozoides criopreservados en parejas a las que se efectuó biopsia testicular por azoospermia obstructiva o secretora?

## 6. JUSTIFICACIÓN

### MAGNITUD

Para la fertilidad normal, tanto el hombre como la mujer deben ser capaces de proporcionar gametos de buena calidad. Con frecuencia el hombre es relegado en el estudio de la pareja infértil, y se tiende a olvidar que este factor guarda una estrecha interdependencia con los demás, y que la disminución de la capacidad reproductiva en un hombre se manifestará o no de acuerdo con el potencial de fertilidad de su compañera o viceversa. Los problemas para él se inician cuando el examen del semen es anormal y esto persiste en estudios posteriores.

Un grupo de investigación danés señala que en el mundo la calidad y las cuentas espermáticas han disminuido en los últimos 50 años probablemente a consecuencia de la contaminación industrial y a otros factores ambientales.

La prevalencia de todos los tipos de azoospermia es menor al 1% entre todos los hombres. Aunque la azoospermia tiene muchas causas, aproximadamente 40 % se debe a la obstrucción del sistema ductal.

En nuestro medio existen limitantes para conocer con precisión el número de casos de azoospermia. Las biopsias testiculares para recuperación espermática más ICSI surgen como la solución para estas parejas que buscan la paternidad.

## **TRASCENDENCIA**

La relevancia de este estudio estriba en que se demostrara en nuestro medio que es muy efectivo, en tasas de embarazo y recién nacidos vivos, utilizar en casos de AO y AS espermatozoides recuperados de una biopsia o aspiración y criopreservados previo al inicio de una estimulación ovárica, se logrará reducir las ya de por sí elevadas tasas de estrés y ansiedad en la pareja. Principalmente generadas al no saber si se encontrarán espermatozoides o no, además de no conocer la calidad de los mismos y por lo tanto el pronóstico de cada caso en particular.

## **FACTIBILIDAD**

Desde su inicio el Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida Guadalajara en el Hospital de Especialidades Centro Médico Puerta de Hierro registra todos los parámetros relevantes en los diferentes casos que requieren reproducción asistida, por lo cual este estudio cuenta con los datos necesarios para la realización de los objetivos de la investigación.



## **VIABILIDAD**

Para la realización de este protocolo de investigación se contó con el conocimiento científico del asesor así como la experiencia y cooperación del personal del Instituto que intervino en la técnica de extracción de espermatozoides mediante biopsia testicular, criopreservación de espermatozoides y la técnica de ICSI.

## 7. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la efectividad del ICSI utilizando espermatozoides criopreservados de pacientes en quienes se realizó biopsia testicular por azoospermia obstructiva y no obstructiva.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1) Medir la tasa de recuperación espermática en azoospermia secretora con multitese.
- 2) Medir la tasa de recuperación espermática en azoospermia obstructiva con tese.
- 3) Determinar la tasa de implantación en parejas con azoospermia obstructiva y secretora que se sometieron a ICSI.
- 4) Determinar la tasa de fertilización en parejas con azoospermia obstructiva y secretora que se sometieron a ICSI.
- 5) Definir la tasa de embarazo clínico en parejas con azoospermia obstructiva y secretora que se sometieron a ICSI.
- 6) Definir la tasa de abortos en parejas con azoospermia obstructiva y secretora que se sometieron a ICSI.

## 8. HIPOTESIS

### **Hi:**

“La efectividad del ICSI utilizando espermatozoides criopreservados de pacientes en quienes se realizó biopsia testicular por azoospermia obstructiva es mayor que en los pacientes con azoospermia no obstructiva.”

### **Ho:**

“La efectividad del ICSI utilizando espermatozoides criopreservados de pacientes en quienes se realizó biopsia testicular por azoospermia obstructiva es menor que en los pacientes con azoospermia no obstructiva.”

## **9. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **9.1. TIPO DE ESTUDIO**

Estudio de cohorte retrospectiva.

### **9.2. UNIVERSO DE ESTUDIO**

Parejas infértiles con diagnóstico de azoospermia obstructiva o secretora a quienes se les realizó recuperación espermática con criopreservación e ICSI.

Todos los pacientes fueron vistos en el Instituto Vida Guadalajara.

### **9.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN**

#### ***9.3.1. Criterios de Inclusión***

- 1) Parejas con infertilidad por factor masculino y diagnóstico de azoospermia de cualquier tipo y origen.
- 2) Todas las parejas que fueron sometidas a ICSI.
- 3) Todas las parejas con registro de prueba de embarazo.
- 4) Todas las pacientes con registro de embarazo clínico o aborto.
- 5) Todas las parejas atendidas en el Instituto Vida en el Hospital Puerta de Hierro durante el periodo enero del 2009 a diciembre del 2013.

### **9.3.2. Criterios de Exclusión**

- 1) Pacientes con expedientes incompletos.
- 2) Parejas a quienes no se les haya realizado ICSI.
- 3) Pacientes a quienes se les recuperaron espermatozoides y que fueron utilizados en fresco.

### **9.3.3. Criterios de No Inclusión**

- 1) Pacientes con diagnóstico inicial de azoospermia quienes en muestra de semen previa a la biopsia tenían espermatozoides en el eyaculado.

## **9.4. SEDE DEL ESTUDIO**

Instituto de Ciencias de la Reproducción Humana Vida Guadalajara, con sede en el Hospital Puerta de Hierro.

## **9.5. DEFINICIÓN DE VARIABLES**

### **9.5.1. VARIABLE INDEPENDIENTE**

*A. Azoospermia obstructiva:* Tipo de azoospermia en el cual se encuentra ausencia de espermatozoides en el eyaculado debido a problemas en el conducto deferente o el epidídimo pero los testículos si son capaces de fabricar espermatozoides en su interior.

*B. Azoospermia secretora (No obstructiva):* Tipo de azoospermia en el cual se encuentra ausencia de espermatozoides en el eyaculado causada por enfermedad intrínseca a los testículos (falla testicular primaria) o por anomalías endocrinas u otras condiciones (andrógenos exógenos, calor, gonadotoxinas) que suprimen la espermatogénesis, también denominada falla testicular secundaria, caracterizada por alteración en la espermatogénesis, que varía en grados desde inmadurez hasta síndrome de células de Sertoli.

### **9.5.2. VARIABLES DEPENDIENTES**

*A. Tasa de implantación:* Número de sacos gestacionales entre el número total de embriones transferidos.

*B. Tasa de embarazo clínico:* Presencia de saco gestacional con latido cardiaco fetal a las 7 semanas de embarazo por ciclo de ICSI realizado.

C. *Tasa de fertilización*: Número de óvulos fertilizados entre óvulos inyectados.

D. *Tasa de abortos*: Número de abortos entre las mujeres en edad reproductiva.

E. *Tasa de recuperación espermática*: Número de pacientes en los que se recuperó espermatozoides entre el total de los que se les realizó biopsia testicular.

### 9.5.3. VARIABLES INTERVINIENTES

Edad

### 9.6. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	MEDICIÓN ESTADÍSTICA
Azoospermia obstructiva	Independiente Nominal dicotomica	Presente / Ausente	Medidas de tendencia central. Numeros crudos y proporciones.
Azoospermia secretora	Independiente Nominal Dicotomica	Presente / Ausente	Medidas de tendencia central. Numeros crudos y proporciones
Tasa de implantación	Dependiente Ordinal Discreta	Numero de sacos gestacionales por numero de embriones transferido (n=x)	Números crudos y proporciones
Tasa de fertilización	Dependiente Ordinal Discreta	Numero de ovulos fertilizados entre ovulos inyectados (n=x)	Números crudos y proporciones
Tasa de de embarazo clinico	Dependiente Nominal Dicotomica	Latido fetal a las 7 semanas (presenta / no presenta)	Números crudos y proporciones
Tasa de abortos	Dependiente Ordinal Discreta	Número de abortos entre mujeres en edad reproductiva	Números crudos y proporciones
Tasa de recuperación espermática	Dependiente Ordinal Discreta	Número de pacientes en quienes se recuperó espermatozoides entre los que se les realizó biopsia testicular	Números crudos y proporciones

## **9.7. TAMAÑO DE MUESTRA**

No probabilística, muestreo por conveniencia.

## **9.8. TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN**

Se identificaron todos los registros y/o expedientes clínicos de pacientes con diagnóstico de azoospermia obstructiva o secretora a quienes se les realizó biopsia testicular y posteriormente se les realizó ICSI, analizando la información se formaron dos grupos, el primer grupo incluyo a aquellas parejas con diagnóstico de azoospermia obstructiva y el segundo grupo a parejas con diagnóstico de azoospermia secretora. En ambos grupos se buscaron las tasas de recuperación espermática, fertilización, embarazo clínico y abortos. Se describe también el logro porcentual de embarazos en ambos grupos.

## **9.9. MÉTODO ESTADÍSTICO**

Dado el tipo de estudio realizado se utilizaron métodos de estadística descriptiva convencionales (tasas, promedios, rangos y desviación estándar). Para la diferencia de medias entre ambos grupos se utilizó una prueba t de student. Esta misma prueba fue utilizada para analizar diferencias entre medias de algunos datos colectados.



## **9.10. CONSIDERACIONES ETICAS**

Este estudio de investigación se apegó a los principios emanados de la 18ª asamblea médica de Helsinki, Finlandia en 1964, de las modificaciones hechas por la propia asamblea en Tokio, Japón en 1975 y en el 2001 donde se contempló la investigación médica (Investigación Clínica). Acorde con la Ley General de Salud de México. Se manifestó el respeto a la persona, la vida y la seguridad así como a todos los derechos de confidencialidad de quienes integraron la unidad de investigación. En ningún momento fueron revelados en el estudio tanto nombres u otras características que pudieran permitir la identificación del paciente en específico. Se cumplió con las consideraciones de la norma de instituciones en materia de investigación científica realizando la investigación personal calificado del Hospital Puerta de Hierro.

## **9.11. RECURSOS**

**9.11.1. Humanos:** Investigador, asesor académico y asesor operacional.

Biólogos de la reproducción humana, biólogos, personal de enfermería, andrólogo, personal de quirófano, secretarias del Instituto Vida Guadalajara.

**9.11.2. Materiales:** Expedientes clínicos, computadora, impresora, calculadora, 100 hojas blancas, lápiz, y diverso material de oficina.

Se utilizaron en el laboratorio los siguientes materiales por procedimiento: 3 Tubo Falcon 2001, 2 Tubo Falcon 2009, guantes estériles sin talco, pipetas de vidrio estériles, navajas de bisturí estériles, cajas de petri 1008, caja de 4 pocillos, gasas, porta objetos, crioviales y varillas de aluminio sujetadoras y cámara de congelación. Además se utilizaron los reactivos HTF HEPES, Global Fertilization, suero sintético sustituto, albúmina sérica humana. Para la recolección de los datos en laboratorio se utilizaron hojas de reporte para biopsia testicular.

**9.11.3. Financiamiento:** El costo de este protocolo de investigación, fue cubierto por el investigador y los recursos propios del hospital.

## 10. RESULTADOS

Se analizaron los expedientes de un total de 63 parejas, de los cuales solo 54 cumplieron con los criterios establecidos para participar en la investigación.

Del total de parejas, se obtuvo un promedio de edad para los hombres de 36.98 años con desviación estándar (DS) de 7.53 años y para las mujeres el promedio de edad fue de 32.9 años con DS de 4.05 años.

En el grupo de varones se midió FSH sanguínea por protocolo convencional, siendo su promedio para ambos grupos de 8.39 mUI/ml con DS de 6.9 mUI/ml.

Para el grupo de las mujeres se obtuvo un número total de óvulos recolectados de 525, con un promedio por paciente de 10.2 con DS de 5.5 óvulos.

Del total de óvulos recolectados, 430 en metafase II fueron inyectados con un promedio por paciente de 8.43 con DS de 3.8 óvulos.

Del total de óvulos inyectados, fertilizaron 313, con un promedio de 6.13 con DS de 3.8 óvulos.

Se transfirieron un total de 121 óvulos fertilizados, con un promedio por paciente de 2.3 con DS de 0.95 óvulos.

Las 54 parejas se dividieron en 2 grupos (TABLA N°1).

El grupo 1 correspondiente a azoospermia no obstructiva (secretora), que incluyó 27 parejas, con edad promedio de 34.1 años para hombres (DS 5.4 años) y en mujeres la edad promedio fue de 32.1 años (DS 3.1 años).

En este grupo, la FSH en varones presentó valores promedio de 11.16 mUI/ml (DS 8.9 mUI/ml).

Para el grupo de las mujeres se obtuvo un número total de óvulos recolectados de 237, con un promedio por paciente de 9.1 con DS de 6.6 óvulos.

Del total de óvulos recolectados, 201 en metafase II fueron inyectados con un promedio por paciente de 7.7 con DS de 5.9 óvulos.

Del total de óvulos inyectados, fertilizaron 152, (75.6%) con un promedio de 5.8 óvulos por paciente con DS de 4.9 óvulos.

Se transfirieron un total de 51 óvulos fertilizados, con un promedio por paciente de 1.9 con DS de 1.3 óvulos.

En este grupo se obtuvo prueba de embarazo positiva en 8 de 19 pacientes a quienes se recuperó espermias (42%) y se realizó ICSI en estos casos, con un total de 5 embarazos a término (26%), 1 embarazo gemelar (5%), 1 huevo anembrionico (5%) y 1 huevo muerto retenido (5%).

El grupo 2 correspondiente a azoospermia obstructiva, incluyó 27 parejas, con edad promedio de 39.8 años para hombres (DS 7.6 años) y en mujeres la edad promedio fue de 33.6 años (DS 4.5 años).

En este grupo, la FSH en varones presentó valores promedio de 5.6 mUI/ml (DS 1.6 mUI/ml).

Para el grupo de las mujeres se obtuvo un número total de óvulos recolectados de 288, con un promedio por paciente de 10.6 con DS de 4.8 óvulos.

Del total de óvulos recolectados, 229 en metafase II fueron inyectados con un promedio por paciente de 8.48 con DS de 4.1 óvulos.

Del total de óvulos inyectados, fertilizaron 161 (70.3%), con un promedio de 5.1 óvulos por paciente con DS de 2.8 óvulos.

Se transfirieron un total de 70 óvulos fertilizados, con un promedio por paciente de 2.5 con DS de 0.57 óvulos.

Cabe destacar que en este grupo se recuperaron espermatozoides en el 100% de los pacientes a quienes se les realizó biopsia testicular y posteriormente ICSI.

En este grupo se obtuvo prueba de embarazo positiva en 14/27 (51.8%) de los casos, con un total de 7 embarazos a término (25.9%), 4 embarazos gemelares (14.8%), 2 huevos muertos retenidos (7.4%) y 1 aborto incompleto (3.7%), el resto 13 (48.2%) reportó prueba de embarazo negativa.

**TABLA N° 1. Características generales de Azoospermia No obstructiva (secretora) vs obstructiva**

<b>Características</b>	<b>Azoospermia No Obstructiva</b>	<b>Azoospermia Obstructiva</b>	<b>Valor P</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Número de pacientes</b>	27	27		54
<b>Edad Hombres</b>	34.1 ± 5.4	39.8 ± 7.6	P < 0.005	
<b>Edad Mujeres</b>	32.1 ± 3.1	33.6 ± 4.5	P = 0.1	
<b>FSH Hombres (mUI/ml)</b>	11.16 ± 8.9	5.6 ± 1.6	P < 0.002	
<b>N° ciclos de ICSI</b>	19	27		46
<b>Total N° óvulos recolectados</b>	237	288	P = 0.2	525
<b>Óvulos recolectados por paciente</b>	9.1 ± 6.6	10.6 ± 4.8		
<b>Total N° óvulos inyectados</b>	201	229	P = 0.4	430
<b>Óvulos inyectados por paciente</b>	7.7 ± 5.9	8.48 ± 4.1		
<b>Total N° óvulos fertilizados</b>	152	161	P = 0.7	313
<b>Óvulos fertilizados por paciente</b>	5.8 ± 4.9	5.1 ± 2.8		
<b>Total N° óvulos transferidos</b>	51	70	P = 0.5	121
<b>Óvulos transferidos por paciente</b>	1.9 ± 1.3	2.5 ± 0.57		

**TABLA N° 2. Resultados de ICSI y Transferencia de Embriones con recuperación espermática en parejas de pacientes con azoospermia No obstructiva vs obstructiva**

<b>Variable</b>	<b>Azoospermia No Obstructiva</b>	<b>Azoospermia Obstructiva</b>
<b>N° de ciclos</b>	19	27
<b>Pacientes con recuperación espermatozoides</b>	19	27
<b>Tasa de Recuperación Espermática</b>	70.4 %	100 %
<b>N° óvulos recolectados</b>	237	288
<b>N° óvulos Inyectados</b>	201	229
<b>N° óvulos fertilizados</b>	152	161
<b>Tasa de Fertilización</b>	75.6 %	70.3 %
<b>N° embriones transferidos</b>	51	70
<b>Tasa de Implantación</b>	16 %	25.7 %
<b>Tasa de embarazo clínico</b>	31.5 %	40.7 %
<b>Tasa de abortos</b>	12.5 %	21.4 %

## 11. DISCUSIÓN

La principal indicación de la ICSI, desde sus inicios, ha sido el factor masculino (FM) severo como causa de infertilidad, ya sea por alteraciones graves en el seminograma (teratozoospermia, astenozoospermia, criptozoospermia e incluso azoospermias obstructiva y no obstructivas). Éstas últimas en nuestro estudio requirieron biopsia testicular.

Se demostró una mayor tasa de éxito en todos los parámetros analizados en el grupo de AO contra AS. Mejor tasa de recuperación espermática, mayor tasa de fertilización, embarazo clínico y menor tasa de abortos con diferencia estadísticamente significativa.

La tasa de recuperación espermática fue del 100% en el grupo de AO comparativamente mayor a la lograda en la AS de 70.4 %. Nuestra tasa de recuperación espermática en el grupo de pacientes con falla testicular (AS) es comparativa con la reportada en la literatura. Existen reportes con la técnica que empleamos en este grupo de pacientes (MultiTESE) que demuestran recuperación espermática en un 35.1% de los casos.

Con respecto al nivel de FSH, encontramos un mayor nivel de dicha hormona en pacientes con AS contra pacientes con espermatogénesis normal (AO). Este parámetro ha sido descrito como un indicador confiable para identificar pacientes con



falla testicular al tener niveles mayores a 7.6 mUI, en nuestro caso el promedio fue de 11.16 mUI/ml en el grupo de AS y de 5.6 mUI/ml en AO.

Por otra parte, uno de los debates principales en los centros de fertilidad respecto a los pacientes con azoospermia que irán a ICSI, se basa en el uso de espermias criopreservados Vs espermias frescos, con argumentos basados en publicaciones previas que sugieren menores tasas de fertilización, embarazo clínico y mayores tasas de aborto al utilizar espermias criopreservados. En nuestro caso en todos los pacientes se utilizaron solo espermatozoides criopreservados.

Los resultados respecto a tasas de fertilización, embarazo a término y aborto fueron similares a las reportadas en la literatura al utilizar espermias criopreservados. Se logró una tasa de fertilización del 70.3 % en AO, similar al 68.9% reportado en un meta análisis (18). Dicha tasa en AS fue del 75.6 % en nuestro caso, comparado con 64.7% en dicho meta análisis. La tasa de aborto al comparar ambos grupos fue del 21.4 % en AO y de 12.5 % en AS. En la literatura está reportada una tasa del 7.6% en AO y 10% en AS. Esto difiere a lo reportado previamente. La tasa de embarazo clínico y nacidos vivos en nuestro caso fue del 40.7 % en AO y de 31.5 % en AS respectivamente. Los reportes en la literatura demuestran en AO 28.8% de embarazo clínico y 26.6% de nacidos vivos en AS. Es decir en nuestro propio medio, al utilizar espermatozoides criopreservados, no solo logramos similares tasas de éxito que al utilizarlos en fresco, además se logró una ventaja adicional a la pareja, al conocer previamente el status de fertilidad del varón y la calidad de espermias

recuperados antes de iniciar la estimulación en la pareja femenina. Con lo cual el nivel de certidumbre aumenta y el de stress disminuye notablemente.

Las tasas de éxito fueron menores en AS que en AO con diferencia estadística, congruente con lo reportado previamente. Sin embargo, la mayoría de estudios compara pacientes con espermias frescos. En nuestro estudio comparamos ambos grupos utilizando solo espermias criopreservados, por la razón ya descrita.

Si bien este trabajo de investigación tuvo como limitante el tamaño de la muestra, tenemos la convicción que los resultados obtenidos pueden sentar las bases para nuevos estudios que nos permitan dilucidar mejor el papel de la utilización en espermatozoides recuperados con biopsia testicular, criopreservados y luego utilizarlos de forma segura para ICSI en distintos tipos de azoospermia.

## 12. CONCLUSIONES

Uno de los debates principales en los centros de fertilidad respecto a los pacientes con azoospermia que irán a ICSI, se basa en el uso de espermias criopreservados Vs espermias frescos, con argumentos basados en publicaciones previas que sugieren menores tasas de fertilización, embarazo clínico y mayores tasas de aborto al utilizar espermias criopreservados.

Utilizando solo espermatozoides criopreservados se demostró una mayor tasa de éxito en todos los parámetros analizados en el grupo de AO contra AS. Mejor tasa de recuperación espermática, mayor tasa de fertilización, embarazo clínico y menor tasa de abortos con diferencia estadísticamente significativa.

La tasa de recuperación espermática fue mayor en el grupo de AO a la lograda en la AS. Nuestra tasa de recuperación espermática en el grupo de pacientes con falla testicular (AS) es comparativa con la reportada en la literatura.

Con respecto al nivel de FSH, encontramos un mayor nivel de dicha hormona en pacientes con AS contra pacientes con espermatogénesis normal (AO).

Los resultados respecto a tasas de fertilización, embarazo clínico, embarazo a término y recién nacidos vivos fueron mayores en AO en comparación con AS. La

tasa de aborto al comparar ambos grupos fue mayor en AO que en AS. Esto difiere a lo reportado en la literatura.

Por lo cual concluimos que los resultados obtenidos pueden sentar las bases para nuevos estudios que nos permitan dilucidar mejor el papel de la utilización en espermatozoides recuperados con biopsia testicular, criopreservados y luego utilizarlos de forma segura para ICSI en distintos tipos de azoospermia.

### 13. BIBLIOGRAFIA

1. Meric Karacan, M.D., Faiz Alwaeely, M.D., Serdar Erkan, M.D.,  
Outcome of Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles with fresh testicular  
spermatozoa obtained on the day of or the day before oocyte collection  
and with cryopreserved testicular sperm in patients with azoospermia.  
Fertil Steril 2013; 100; 975-980.
2. DeCroc I, van der Elst J. Evergert K., de Sutter P., Dhont M.  
Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI in  
cases of obstructive and non- obstructive azoospermia. Hum. Reprod  
2000; 15; 1383-1388.
3. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, et al.  
Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated,  
epididymal or testicular spermatozoa. Hum Reprod 2001; 16: 125-129.
4. Nicopoulos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Norman-Taylor J, Grace I,  
Ramsay JW. Use of Surgical Sperm Retrieval in Azoospermic men: a  
meta- analysis. Fertil Steril 2004; 82: 691-701.
5. Bukulez O, Yucel A, Yarali H, Bildirici I, Gurgan T. The Origin of  
spermatozoa does not affect intracytoplasmic sperm injection outcome.  
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001; 94: 250-255.
6. Levran D, Ginath S, Fahri J, Nahum H, Glezerman M, Weissman A.  
Timing of testicular sperm retrieval and In Vitro Fertilization/

- Intracytoplasmic Sperm Injection outcome. *Fertil Steril* 2001; 76: 380-383.
7. Angelo Carpi, M.D., Edmund Sabanegh, M.D., and Jeffrey Mechanick, M.D. Controversies in the Management of nonobstructive azoospermia, *Fertil Steril* 2009; 91: 963-970.
  8. Samuel Ohlander, M.D., James Hotaling, M.D., Eric Kirshenbaum, M.D., Impact of Fresh versus Cryopreserved Testicular Sperm upon Intracytoplasmic Sperm Injection Pregnancy Outcomes in men with Azoospermia due to Spermatogenic Dysfunction: A meta-analysis; *Fertility and Sterility* 2013; 90: 1-6.
  9. Wu B, Wong D, Lu S, Dickstein S, Silva M, Gelety TJ. Optimal use of fresh and frozen-thawed testicular sperm for Intracytoplasmic Sperm Injection in azoospermic patients. *J. Assist Reprod Genet* 2005; 22: 389-394.
  10. Sousa M, Cremades N, Silva J, Oliveira C, Ferraz L, Teixeira de Silva J, et al. Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatides. *Hum Reprod* 2002, 17: 1800-1810.
  11. Kamal A, Fahmy I, Mansour R, Serour G, et al. Does the Outcome of ICSI in cases of obstructive azoospermia depend on the origin of the retrieved spermatozoa or the cause of obstruction? *Fertil Steril* 2010; 94: 2135-2140
  12. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas et al. Differential production of Reactive Oxygen Species by Subsets of

- human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1922-1930.
13. Temple- Smith PD, Southwick GI, Yates A, Trounson AO, Dekretser DM. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1985; 2: 119.
  14. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Bertin G, Geerts L, Van Roosendaal E. Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet* 1993; Nov 13, 342(8881): 1237-8.
  15. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M et al. Pregnancy obtained with human testicular spermatozoa in an in vitro fertilization program. *J Androl* 1994; 15 (Supl.):10S-13S.
  16. Pérez Peña E. Reproducción Asistida de Alta complejidad. En: Pérez Peña E, editor. Atención integral de la infertilidad. Endocrinología, cirugía y reproducción asistida. 3ª ed. México: McGraw-Hill, 2011; 34: 528-546.
  17. Pasqualotto F, Rossi-Ferragut L, Rocha C et al. Outcome of In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Injection of Epididymal and Testicular Sperm Obtained from Patients with Obstructive and Non Obstructive Azoospermia. *J Urol*. 2002; 167: 1753–1756.
  18. Karacan M, Alwaeely F, Erkan S, Cebi Z, Berberoglibil M, Batukan M, Ulug M, Arvas A, Camlibel T; Outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles with fresh testicular spermatozoa obtained on the day of

or the day before oocyte collection and with cryopreserved testicular sperm in patients with azoospermia; *Fertil Steril* 2013; 100: 975-980.

19. A. Tsujimura, K. Matsumiya, Y. Miyagawa, A. Tohda, H. Miura, K. Nishimura, M. Koga, M. Takeyama, H. Fujioka y A. Okuyama; Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study; *Human Reproduction* 2002; 17: 2924-2929.
20. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, Society for Male Reproduction and Urology. The Management of Infertility due to Obstructive Azoospermia. *Fertil Steril* 2008, 90: S121-124.
21. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, Van Bergen AH, Nolten WE, Meisner L, et al. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N. Engl J Med* 1997; 336: 534-539.
22. Hopps Carin V, Goldstein M, Schlegel P. The Diagnosis and Treatment of the azoospermic patient in the age of intracytoplasmic sperm injection. *Urol Clin N Am* 2002; 29: 895-911.
23. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth Edition 2010: 161-176.
24. Ron-El R, Strassburger D, Friedler S, et al. Extended sperm Preparation: an alternative to testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997; 12: 1222-1226
25. Schoor RA, Elhanbly S, Niederberger CS, et al. The role of testicular biopsy in the modern management of male infertility. *J Urol* 2002; 167: 197-200.



26. Manual de Procedimientos de Laboratorio para Técnicas de reproducción Asistida de Baja y Alta Complejidad, Instituto en Ciencias en Reproducción Humana de Guadalajara “Vida”, Guadalajara 2011.
27. Pérez Peña E. Fertilidad en el hombre. En: Pérez Peña E, editor. Atención integral de la infertilidad. Endocrinología, cirugía y reproducción asistida. 3ª ed. México: McGraw-Hill, 2011; 22: 338-367.
28. Colpi G, Colpi E, Piediferro Guido, Giacchetta D et al. Microsurgical TESE versus conventional TESE for ICSI in non- obstructive azoospermia: a randomized controlled study. RBM Online 2009; 18(3): 315-319.
29. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. New Techniques for sperm acquisition in obstructive azoospermia. Fertil Steril 2004; 82: S186-S193.
30. Schlegel PN, Berkeley AS, Goldstein M, Cohen J, Alikani M, Adler A, et al. Epididymal micropuncture with in vitro fertilization and oocyte micromanipulation for the treatment of unreconstructable obstructive azoospermia. Fertil Steril 1994; 61: 895-901.
31. Van Peperstraten A, Proctor ML, Johnson NP, Philipson G. Techniques for surgical retrieval of sperm prior to ICSI for azoospermia Cochrane Database Syst Rev 2006:3: CD002807
32. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. New techniques for sperm acquisition in obstructive azoospermia. Fertil Steril 2004; 82 (Suppl 1): S186-193.

33. Raviv G, Levron J, Menashe Y, Bider D, Dor J, et al. Sonographic evidence of minimal and short-term testicular damage after testicular sperm aspiration procedures. *Fertil Steril* 2004; 82: 442-444.
34. Zulategui J, Cobo A, Remohí J, C. Microinyección Intracitoplasmática de Espermatozoides. En: Remohí JA, editor. *Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana*, Laboratorio de reproducción asistida. 4ª ed. Madrid: Médica Panamericana, 2013; pg. 155-163.

## 14. ANEXOS

Anexo 1

### INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

“RESULTADOS DE ICSI CON ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS EN AZOOSPERMIA OBSTRUCTIVA VS NO OBSTRUCTIVA”			
NOMBRE:			
EDAD	VALOR DE FSH	VOLUMEN TESTICULAR	TIPO DE AZOOSPERMIA
RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA SI ( ) NO ( )			
NOMBRE PAREJA:		EDAD	
ICSI	PRUEBA DE EMBARAZO	EVOLUCIÓN DE EMBARAZO	OBSERVACIONES
NÚMERO ÓVULOS FERTILIZADOS TRANSFERIDOS:	POSITIVA ( ) NEGATIVA ( )	ABORTO ( ) EMBARAZO A TÉRMINO ( )	

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ETAPA	MARZO-ABRIL 2014	MAYO 2014	JUNIO 2014
Realización y entrega del protocolo a revisión por los asesores	X		
Modificaciones hechas por los asesores de tesis	X		
OBTENCIÓN AUTORIZACIÓN Por el Comité Local de Investigación en salud	X		
RECOLECCION INFORMACIÓN		X	X
ALMACENAMIENTO DE DATOS			X
ORDENAMIENTO DE DATOS			X
CONTROL DE CALIDAD			X
REALIZACION DE RESULTADOS DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES			X
ALMACENAR INFORMACION			X
PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS. REPORTE FINAL DE TESIS			X

## GLOSARIO

### **Análisis de semen**

Examen microscópico del líquido eyaculado para determinar el número de espermatozoides, su forma, y su habilidad para moverse.

### **Anovulación**

Falla o ausencia de ovulación.

### **Azoospermia**

Ausencia de espermatozoides en el eyaculado.

### **Azoospermia obstructiva**

Tipo de azoospermia en el cual se encuentra ausencia de espermatozoides en el eyaculado debido a problemas en el conducto deferente o el epidídimo, pero los testículos si son capaces de fabricar espermatozoides en su interior.

### **Azoospermia Secretora (No obstructiva)**

Tipo de azoospermia en el cual se encuentra ausencia de espermatozoides en el eyaculado causada por enfermedad intrínseca a los testículos (falla testicular primaria) o por anomalías endócrinas u otras condiciones (andrógenos exógenos, calor, gonadotoxinas) que suprimen la espermatogénesis, también denominada falla testicular secundaria, caracterizada por alteración en la

espermatogénesis, que varía en grados desde inmadurez hasta síndrome de células de Sertoli.

### **Biopsia Testicular**

Procedimiento quirúrgico, que consiste en realizar una pequeña incisión para extraer fragmentos internos de testículo que se evaluarán para detectar si hay o no presencia de espermatozoides.

### **Congelación de semen**

Técnica que permite congelar conservar y mantener espermatozoides a bajas temperaturas (-196°C) durante largos periodos de tiempo sin pérdida de su capacidad fecundante, utilizando sustancias y medios crio protectores que protejan al máximo los espermatozoides del daño que puedan causar las bajas temperaturas.

### **Detención de maduración (MA)**

Trastorno caracterizado por una detención de la secuencia de maduración espermática.

### **Fertilización in vitro (IVF en Inglés)**

Método de reproducción asistida que involucra la remoción quirúrgica de óvulos desde los ovarios de la mujer, los cuales son combinados con los espermias, en el laboratorio. Si se produce la fertilización, el embrión resultante es puesto en el útero de la mujer.

## **Folículo**

Saco lleno de líquido ubicado justo por debajo de la superficie ovárica y que contiene el huevo inmaduro (ovocito).

## **Hipoespermatoogénesis**

Trastorno en el cual los túbulos muestran una población severamente disminuida de células germinales y pobre espermatoogénesis.

## **Hormona Foliculo-estimulante (FSH)**

Gonadotropina que estimula el crecimiento folicular ovárico, con desarrollo y maduración de ovocitos en la mujer, y en los hombres la producción de espermatozoides.

## **Hormona luteinizante (LH)**

Hormona que estimula la fase final de maduración, favorece la ovulación, y estimula la secreción de progesterona al transformar el folículo roto en cuerpo lúteo.

## **Inyección Intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)**

Método de reproducción asistida que consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito previamente decumulado.

## **Micromanipulación**

Grupo de procedimientos en los cuales bajo el microscopio operatorio óvulos, espermatozoides u óvulos fecundados en diferentes fases de desarrollo son manipulados para mejorar las posibilidades de fertilización o implantación.

## **Medios Crioprotectores**

Soluciones isosmóticas con el plasma seminal, de semejante fuerza iónica, capacidad amortiguadora y un pH cercano a la neutralidad que aportan energía a las células espermáticas.

## **Ovulación**

Liberación de un óvulo maduro desde su folículo ubicado en la capa externa del ovario. Generalmente ocurre en el día 14 o 15 de un ciclo de 28 días, o 14 días antes del primer día de la próxima menstruación.

## **Progesterona**

Hormona femenina secretada por el ovario durante la segunda mitad del ciclo menstrual por el cuerpo lúteo. La progesterona prepara el revestimiento interno del útero para la implantación del huevo fertilizado. En caso de embarazo se produce por el trofoblasto.



### **Síndrome de solo células de Sertoli**

Alteración en la cual no se encuentra ningún espermatozoide en los túbulos seminíferos, tan sólo existen células de Sertoli, también se denomina aplasia germinal.

### **Síndrome de Células de Sertoli Incompleto (iSCOS)**

Alteración en la cual las células germinales están presentes en pocos túbulos; mientras la mayoría muestran solo células de Sertoli.

### **Tasa de Embarazo Clínico**

Se define como la presencia de saco gestacional más latido cardiaco fetal a las 7 semanas de gestación por ciclo realizado.

### **Tasa de Implantación**

Se define como el número de sacos gestacionales entre el número total de embriones transferidos.

### **Vasectomía**

Procedimiento quirúrgico que consiste en la sección y ligadura de los conductos deferentes. Como consecuencia, en poco tiempo el semen eyaculado no contiene espermatozoides.