

CASO CLÍNICO

Nacimiento de una niña sana tras un ciclo de inyección intracitoplasmática con espermatozoides testiculares descongelados de un varón con microdelección de la región AZFc del cromosoma Y

Rocío Núñez Calonge, Susana Cortés Gallego, Luis González-Viejo Gómez, Marta Gago García, Luis Clemente Ramos, Manuel Nistal Martín Serrano, Braulio Peramo Moya y Pedro Caballero Peregrín

Unidad de reproducción. Clínica Tambre. Madrid. España.

RESUMEN

Las microdelecciones del cromosoma Y constituyen un importante factor etiológico en el fallo de la espermatogénesis. Varios estudios indican una prevalencia del 5 al 20% en varones con azoospermia u oligo-azoospermia severa. Ya que en muchos casos las alteraciones en la producción espermática son progresivas, la criopreservación de espermatozoides testiculares es una buena opción para poder utilizar los gametos en varios ciclos de microinyección intracitoplasmática (ICSI).

Se presenta el caso clínico de un varón de 42 años, que acude a la consulta de esterilidad de la Clínica Tambre tras 8 años de esterilidad atribuida a una azoospermia no obstructiva, con microdelección en la región D4S240 del gen *AZFc*. En la realización de biopsia de testículo bilateral se obtuvieron unos pocos espermatozoides, inmóviles, que se criopreservaron. Tras 2 ciclos de ICSI utilizando los espermatozoides previamente criopreservados y mantenidos en cultivo hasta conseguir móviles, su mujer quedó gestante, dando a luz una niña sana.

Palabras clave: Microdelección cromosoma Y. Azoospermia. Biopsia testículo. Congelación espermatozoides.

ABSTRACT

Birth of a healthy girl after a cycle of intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed testicular spermatozoa from a man with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome

Deletion of AZFc region of the Y chromosome is the most frequent molecularly defined cause of spermatogenic failure. Severe spermatogenic compromise may be the result of a Y-chromosomal deletion of the AZFc region.

Unfortunately, 25-30% of men who have non-obstructive azoospermia will suffer of germinal epithelium degradation such that they will have no spermatogenic ability a short time later, making ICSI an impossibility.

The use of frozen-thawed testicular tissue intentionally retrieved at a time remote from any ICSI cycle may solve these problems.

A case is reported in which a pregnancy was achieved by ICSI with testicular sperm extraction (TESE), using spermatozoa from an azoospermic man carrying a Y chromosomal microdeletion confined to the AZFc region who used their frozen-thawed testicular samples.

Key words: Y chromosome deletion. Azoospermia. Testicular biopsy. Sperm freezing.

Correspondencia: Dra. R. Núñez Calonge.
Unidad de Reproducción. Clínica Tambre.
Tambre, 8. 28002 Madrid. España.
Correo electrónico: rocio@clinicatambre.com

INTRODUCCIÓN

El cromosoma Y juega un papel fundamental no sólo en la determinación del sexo, sino en el control de la espermatogénesis. Las microdelecciones del cromosoma Y constituyen un importante factor etiológico en el fallo de la espermatogénesis. Varios estudios indican una prevalencia del 5 al 20% en varones con azoospermia u oligozoospermia severa¹.

Los genes relacionados con la fertilidad masculina se localizan en el brazo largo del cromosoma Y (Yq 11), en la denominada *azoospermic zone factor* (AZF). En ésta se delimitan 3 intervalos bien diferenciados: AZFa, AZFb y AZFc, así como una cuarta región denominada AZFd, localizada entre AZFb y AZFc. Cada una de estas zonas presenta diferentes genes candidatos que intervienen en la esterilidad masculina².

No hay correlación estricta entre la delección y el fenotipo histológico en la biopsia testicular. Sin embargo, en la mayoría de los estudios se ha observado que la presencia de delecciones AZFa y AZFb proximales se relaciona con graves defectos en la espermatogénesis (síndrome de sólo células de Sertoli), mientras que delecciones de AZFb distal y AZFc tienen diferentes grados de fallo en la espermatogénesis³⁻⁵. Ya que en muchos casos las alteraciones en la producción espermática son progresivas, la criopreservación de espermatozoides testiculares es una buena opción para poder utilizar los gametos en varios ciclos de microinyección intracitoplasmática (ICSI [*intracytoplasmic sperm injection*]).

CASO CLÍNICO

Varón de 42 años, que acude a la consulta de esterilidad de la Clínica Tambre tras 8 años de esterilidad atribuida a una azoospermia no obstructiva. El paciente presentaba un cariotipo 46 XY normal realizado por análisis citogenético convencional. El examen físico general y genital, que valoró especialmente tamaño y morfología testicular, era normal. Asimismo, se encontraron dentro de los límites de la normalidad la FSH, LH, prolactina, testosterona y estradiol. Se realizó estudio de microdelecciones de la región AZF del cromosoma Y en el ADN extraído de linfocitos de sangre periférica, utilizándose la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las distintas regiones del cromosoma Y. Los resultados obtenidos demostraron una microdelección en la región D4S240 del gen AZF.

El estudio de la mujer, de 41 años de edad, reveló ciclos ovulatorios normales, por lo que se efectuó una

biopsia de testículo del paciente para la recuperación espermática y criopreservación antes del ciclo de ICSI. La biopsia testicular bilateral se llevó a cabo bajo sedación y según técnica habitual: se abrió la túnica albugínea, se expuso el parénquima testicular y se extrajeron 2 muestras: una para estudio anatopatológico y otra para recuperación espermática.

La búsqueda y recuperación espermática se realizó de la siguiente forma⁶: el tejido testicular obtenido en la biopsia se colocó en placas Petri con medio de cultivo Sperm Prep (Medi-Cult). Allí se dislaceró el tejido utilizando 2 portaobjetos hasta que se consigue romper en lo máximo posible los túbulos y extraer todo el contenido al medio. Una vez completada la dislaceración, se comprobó al microscopio invertido (400×) la presencia de espermatozoides. Después de recorrer más de 50 campos, únicamente se pudo hallar un único espermatozoide inmóvil. El medio de cultivo se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml y la muestra se centrifugó durante 5 min a 300 g. Después de la centrifugación, se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendería en medio IVF (Medi-Cult). Ya que prácticamente no se observaron espermatozoides, únicamente se añadió 0,2 ml de medio de cultivo. Una vez añadido el medio de cultivo se evaluó de nuevo, con 20 µl de la muestra, la presencia de espermatozoides, y se encontró algún espermatozoide aislado cada 10 o 12 campos de 20× (fig. 1). Tras la observación, se dejaron los tubos en el incubador a 37 °C y una atmósfera del 5% de CO₂ durante 1 h, después de lo cual la muestra se congeló con el método de píldoras.

A continuación se describe el método de congelación^{7,8}:

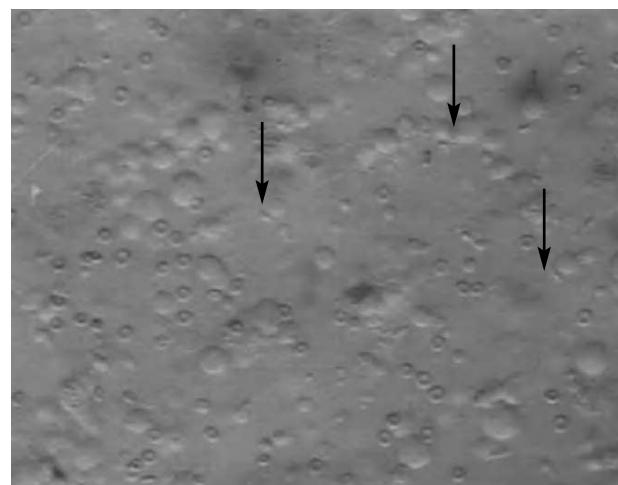


Figura 1. Muestra inicial de biopsia de testículo (200×). Las flechas muestran la presencia de espermatozoides (initialmente inmóviles).



Figura 2. Muestra de biopsia de testículo tras 4 h de incubación en micropipetas (400×).

1. Se diluyen las muestras de semen (una vez centrifugado el material de la biopsia testicular y resuspendido con el medio de cultivo) con el crioprotector (Criosperm) a concentración 1:1.

2. Los tubos con la muestra y el diluyente se introducen en un matraz con agua a temperatura ambiente al nivel del volumen del tubo.

3. Los matraces se mantienen en nevera (4 °C) durante 45 min.

4. Mientras tanto, se prepara el bloque de nieve carbónica (Air Liquide): en el bloque se practican orificios dejando durante unos segundos por presión, una serie de tornillos clavados en una madera.

5. Transcurridos los 45 min se sacan los tubos de la nevera, y con una pipeta Pasteur se van situando gotas en cada uno de los orificios practicados en la nieve carbónica (cada gota tiene que ser de 10 µl).

6. En 2-3 min las gotas cambiarán de color, y cuando se hayan congelado se pasan a los criotubos, que previamente se habrán mantenido en nitrógeno líquido.

7. Los criotubos se llevan al nitrógeno líquido para su conservación a -196 °C.

Las muestras obtenidas para estudio histológico se fijaron en Bouin acuoso, tras lo cual se siguió con la técnica hasta obtener cortes de 3 µ. Los resultados anatomo-patológicos mostraron la presencia de únicamente células de Sertoli en el testículo izquierdo, sin células germinales en todo el material testicular examinado. El estudio histológico en el testículo derecho era compatible con un patrón mixto con sólo células de Sertoli en el 90% de los túbulos.

La pareja realizó 2 ciclos de ICSI con espermatozoides descongelados de la biopsia de testículo. En el primer ciclo, tras inducción de ovulación con gonadotropinas recombinantes (3.100 UI de FSH recombinante) se obtuvieron 4 ovocitos, todos ellos metafase II.

La recuperación de espermatozoides móviles se realizó tras la incubación de los espermatozoides descongelados en micropipetas, de la siguiente forma:

– Se descongelaron 3 píldoras del total de la muestra, que se centrífugó durante 5 min a 300 g. Después de la centrifugación se decantó el sobrenadante y el沉淀 se resuspendió en 0,5 ml de medio IVF.

– Tras incubar a 37 °C durante 1 h, se preparó una placa de ICSI y se colocaron 5 µl de la muestra en micropipetas, y se incubó durante 2 h más.

– Se realizó la búsqueda de los espermatozoides móviles tras un total de 4 h de incubación (fig. 2).

A las 18 h de la microinyección de los 4 ovocitos se observaron signos de fecundación en 3 ovocitos. A las 24 h se desarrollaron 3 embriones de grado 2, que se transfirieron sin conseguirse gestación.

En el segundo ciclo de ICSI, con similares concentraciones de FSH recombinante, se obtuvieron también 4 ovocitos, 3 de ellos metafase II. Se observaron signos de fecundación normal a las 18 h de la microinyección en los 3 y se transfirieron 3 embriones de grados 2 y 3 a las 24 h (fig. 3). Dos semanas después de la transferencia, la concentración sérica de beta-hCG era de 258 UI/l. Cuatro semanas más tarde, se comprobó por ecografía transvaginal, un saco intrauterino único, con latido cardíaco. A las 38 semanas de gestación tuvo lugar por cesárea el nacimiento de una niña sana de 3.500 g.

DISCUSIÓN

La delección completa de la región AZFc del cromosoma Y es responsable del fallo de espermatoformación en varones infériles. Aunque esta delección se ha asociado



Figura 3. Embriones transferidos tras la microinyección de ovocitos con espermatozoides de testículo descongelados.

a distintos fenotipos testiculares que pudieran ser compatibles con el desarrollo de espermatozoides, también se han constatado casos de peor pronóstico, en los que no hay progresión de la espermatogénesis o ésta está disminuida^{9,10}. En este último caso, la criopreservación de espermatozoides testiculares es una herramienta muy valiosa para preservar la fertilidad. Sin embargo, también hay que tener en cuenta la transmisión de un defecto genético a la descendencia¹¹.

La principal contribución de este caso se refiere a que, por primera vez, se ha conseguido una gestación con espermatozoides de un varón con microdeleción de la región AZFc del cromosoma Y con las siguientes características:

– El estudio histológico mostró la presencia de espermatogénesis conservada únicamente en el 10% de los túbulos de un solo testículo, como lo indicó el hecho de encontrar muy aislados espermatozoides en el material testicular obtenido en la biopsia.

– A pesar de no observar espermatozoides móviles tras la biopsia testicular, con la técnica de congelación en píldoras y posterior cultivo de éstos, se consiguió obtener espermatozoides móviles para poder realizar la microinyección espermática.

– La tasa de fecundación, división y calidad embrionaria con estos espermatozoides, pese a los datos publicados en la bibliografía^{12,13}, no fue inferior a la que se presenta normalmente en nuestra casuística.

– Previo a la realización del ciclo de ICSI se informó a la pareja, que firmó el correspondiente consentimiento, de los posibles riesgos de transmisión del mismo defecto en caso de nacimiento de un varón. Sin embargo, afortunadamente, la mujer quedó gestante y dio a luz una niña sana.

CONCLUSIÓN

Como sugieren nuestros datos, la utilización de espermatozoides de testículo congelados y descongelados, en varones con microdeleción de la región AZFc del cromosoma Y, es eficaz y puede solucionar muchos de los problemas inherentes a la utilización de espermatozoides frescos de testículo, incluso consiguiéndose muy pocos e inmóviles. Ya que la criopreservación en píldoras permite la realización de varios ciclos de ICSI, no es necesaria la realización de más biopsias de testículo con cada ciclo de inducción de la ovulación de la mujer, asegurándose la disponibilidad de espermatozoides antes de cada ciclo.

Bibliografía

1. Vogt PH. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod.* 1998;4:739-44.
2. Foresta C, Fertilin A, Garolla A. High frequency of well-defined Y chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod.* 1998;13:302-7.
3. Kleiman SE, Bar-Shira Maymon B, Yogeve L, Paz G, Yavetz H. The prognostic role of the extent of Y microdeletion on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. *Hum Reprod.* 2001; 16:399-402.
4. Hucklenbroich K, Gromoll H, Heinrich M, Hohoff C, Nieschlag E, Simoni M. Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum Reprod.* 2005;20:191-7.
5. Figueiroa Sosa V, Fumero Arteaga S, Taracena Lafuente JM, Báez Quintana D, Salido Ruiz E, Rodríguez Hernández P, et al. Relevancia clínica e histopatológica de las delecciones del cromosoma Y en la población canaria. *Rev Int Androl.* 2006; 4:94-7.
6. Núñez R, Cortés S, Agustín S, González Viejo L, Ovejero E, Gago M, et al. Increased fertilization rates after in-vitro culture of frozen-thawed testicular sperm. Berlin: 20 Congreso de la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología (ESR-HE); 2004.
7. Caballero P, Vázquez I, Navío, S, Allona A, Gutiérrez C. Vialidad espermática a través de diferentes medios de congelación. Palma de Mallorca: I Congreso Nacional de Andrología (ASESA); 1983.
8. Núñez R, Cortés S, Agustín S, Caballero P. Influencia del procesamiento de las muestras de biopsia testicular en los resultados de ICSI. Actualidad Andrológica. 2002;10:13-21.
9. Cram DS, Osborne E, McLachlan RI. Y chromosome microdeletions: implications for assisted conception. *Med J Aust.* 2006;185:433-4.
10. Hucklenbroich K, Gromoll J, Heinrich M, Hohoff C, Nieschlag E, Simoni M. Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum Reprod.* 2005;20:191-7.
11. Lee SH, Ahn SY, Lee KW, Kwack KB, Jun HS, Cha KY. Intracytoplasmic sperm injection may lead to vertical transmission, expansion, and de novo occurrence of Y-chromosome microdeletions in male fetuses. *Fertil Steril.* 2006;85:1512-5.
12. Van Golde RJ, Wetzels AM, de Graaf R, Tuerlings JHAM, Braat DDM, Kremer JAM. Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligozoospermic men with microdeletions in the azoospermia factor C region of the Y chromosome. *Hum Reprod.* 2001;16:289-92.
13. Choi JM, Chung P, Veeck L, Mielnik A, Palermo GD, Schlegel PN. AZF microdeletions of the Y chromosome and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril.* 2004;81:337-41.