

Revista Internacional de Andrología

www.elsevier.es/andrologia



CASO CLÍNICO

Vitrificación de espermatozoides: una alternativa a la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en paciente con oligoastenozoospermia severa

Raúl Sánchez^{a,b,*}, Mabel Schulz^{a,b}, Jennie Risopatrón^{a,b,c}, Vladimir Isachenko^d y Evgenia Isachenko^d

^a BIOREN-Centro de Biotecnología en Reproducción, Temuco, Chile

^b Departamento de Ciencias Preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

^c Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

^d Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital de Mujeres, Universidad de Colonia, Colonia, Alemania

Recibido el 16 de agosto de 2012; aceptado el 8 de octubre de 2012

Disponible en Internet el 16 de febrero de 2013

PALABRAS CLAVE

Vitrificación de espermatozoides;
Oligoastenozoospermia;
Inseminación intrauterina

Resumen El tratamiento de elección para pacientes con oligozoospermia severa es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), pero su alto coste limita su aplicación en países cuyos sistemas de salud no cubren este procedimiento médico. La nueva técnica de vitrificación permite almacenar espermatozoides post selección espermática hasta obtener la concentración mínima para realizar ciclos de inseminación intrauterina (IIU). Se presenta este caso clínico de un recién nacido sano, tras dicha técnica, de una pareja (varón 32 años, mujer 31 años) con antecedente de 2 ciclos ICSI, uno de los cuales fue exitoso, con un hijo vivo sano. Espermatozoides móviles fueron obtenidos por *swim-up*, resuspendidos en medio Vitrisperm®, almacenados en pajuelas a una concentración de $0,5-1,5 \times 10^6$ células/ml y vitrificados en contacto directo con nitrógeno líquido. Se realizó estimulación ovárica y la IIU se realizó 36 h después de la administración de hCG. La muestra post desvitrificación presentó una concentración de $3,0 \times 10^6$ espermatozoides móviles. La evolución de un desarrollo fetal normal fue controlada por ecografía 3D, con el posterior nacimiento por parto cesárea de un recién vivo sano de sexo masculino. Aunque son resultados preliminares, la congelación ultrarrápida, al preservar un alto número de espermatozoides con función conservada, genera una alternativa de tratamiento de bajo coste en pacientes con oligozoospermia severa.

© 2012 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rsanchez@ufro.cl (R. Sánchez).

KEYWORDS

Sperm vitrification;
Oligoasthenozoospermia;
Intrauterine
insemination

Vitrification sperm: An alternative to intracytoplasmic sperm injection in oligoasthenozoospermic patient

Abstract Therapy for patients with severe oligozoospermia is the intracytoplasmic sperm injection (ICSI). However, its high cost limits its application in countries whose health systems do not cover this medical technique. The new vitrification technique makes it possible to store sperm after sperm selection until reaching the minimum concentration for cycles of intrauterine insemination (IUI). A clinical case is reported of a couple (male age 32, female age 31) who underwent 2 ICSI procedures, one of which was successful, resulting in the birth of a healthy, live born son. Motile sperm were obtained by swim-up, resuspended in Vitrisperm® medium, stored in straws at a concentration of 0.5 to 1.5×10^6 cells/mL, and vitrified in direct contact by liquid nitrogen. Ovarian stimulation was induced and IUI was performed 36 hours after hCG administration. The post-devitrification sample presented a concentration of 3.0×10^6 motile sperm. The evolution of normal fetal development was controlled by 3D ultrasound and subsequent birth by cesarean delivery of a healthy male newborn. Although these are preliminary results, ultrarapid freezing preserves the physiological function in a high number of spermatozoa. This generates a low-cost alternative treatment for patients with severe oligozoospermia.

© 2012 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El tratamiento de elección para pacientes con oligoasthenozoospermia severa es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (*intracytoplasmic sperm injection* [ICSI]), pero su alto coste limita su aplicación en países cuyos sistemas de salud no cubren este procedimiento médico. Por ello, habitualmente estos pacientes quedan sin terapia y solo tienen la adopción como alternativa terapéutica. La nueva técnica de vitrificación permite almacenar espermatozoides post selección espermática hasta obtener una concentración mínima de espermatozoides para realizar ciclos de inseminación intrauterina (IUI)¹.

La vitrificación es un método de criopreservación ultra rápida que consiste en la exposición directa de la célula en nitrógeno líquido o a sus vapores, evitando así la cristalización del agua intracelular² y el criodañó^{3,4}. Este método no utiliza crioprotectores permeables, que pueden implicar riesgo mutagénico⁵, y se realiza en espermatozoides obtenidos por métodos de selección espermática, lo que garantiza una alta motilidad, y al estar desprovistos de plasma seminal disminuye el riesgo de transmisión de infecciones virales y bacterianas.

Caso clínico

Pareja con 2 procedimientos de ICSI, uno de los cuales fue exitoso, con un hijo vivo sano. Factor femenino estudiado, paciente de 31 años, con ciclos ovulatorios, niveles hormonales dentro de los límites normales. En el varón, de 32 años, el estudio endocrino demostró una TSH de $2,5 \mu\text{U/ml}$ (rango: $0,4$ - $4 \mu\text{U/ml}$), tiroxina de $1,0 \text{ ng/dl}$ (rango: $0,8$ - $2,7 \text{ ng/dl}$), PRL de 16 ng/ml (rango: 1 - 18 ng/ml), FSH de $5,7 \text{ mIU/ml}$ (rango: 1 - 12 mIU/ml), insulina basal de $13 \mu\text{U/ml}$ (rango: 2 - $20 \mu\text{U/ml}$) y testosterona total de 470 ng/dl (rango: 270 - 1.070 ng/dl). El cultivo de semen y las determinaciones

de *Clamidia trachomatis* y *Mollicutes* fueron negativos. La ecografía testicular fue descrita sin hallazgos patológicos y microcalcificaciones. La variación de los parámetros espermáticos principales fue de volúmenes bajos, entre $1,1$ a $1,3 \text{ ml}$, viabilidad del 80%, concentración entre $2,4$ y $4,5 \times 10^6$ espermatozoides motiles/ml, movilidad total (PR + NP) entre el 12 y el 25%, morfología entre el 7 y el 12%. La determinación de fragmentación del ADN por técnica de TUNEL fue de menos del 10%.

Obtención de muestras

Las muestras de líquido seminal fueron obtenidas por masturbación con una abstinencia mínima de 2 días. Las muestras se mantuvieron a 37°C en estufa de cultivo durante 30-60 min hasta su licuefacción. Posteriormente se realizó un espermiograma y la determinación de la integridad del ADN.

Integridad del ADN

La integridad del ADN se evaluó utilizando el test de TUNEL. Esta técnica se basa en la incorporación de nucleótidos marcados en las roturas existentes en el ADN. Se empleó el protocolo del kit comercial *In-situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*, del Laboratorio Roche.

Swim-up

Los espermatozoides fueron separados del líquido seminal por *swim-up*. Para ello, se procedió a lavar la muestra disponiendo alícuotas de $600 \mu\text{l}$ de semen en tubos Falcon. A cada tubo con la muestra se añadieron 5 ml de *human tubal fluid* (HTF) y se centrifugaron a 400g durante 5 min. Para la selección de los espermatozoides se adicionó lentamente al pellet, HTF suplementado con HSA (albúmina

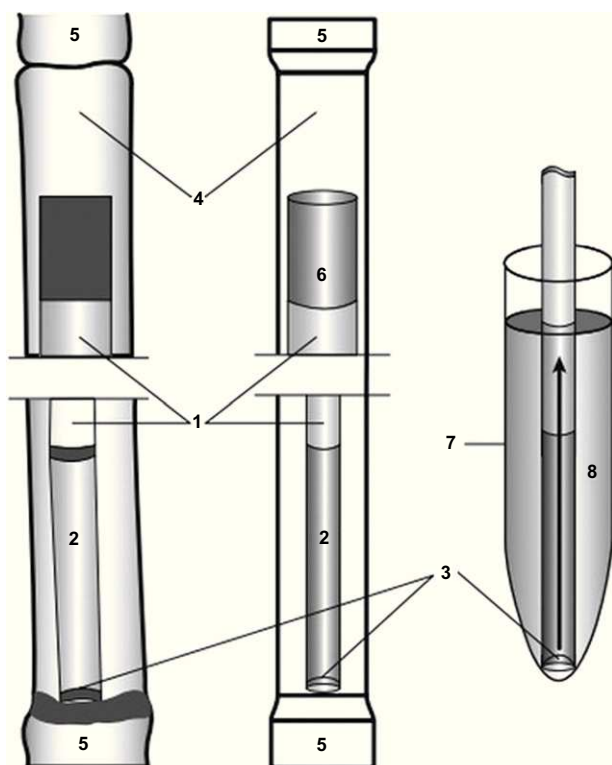


Figura 1 Método de vitrificación aséptica. 1, pajuela interna de 0,25 ml, llena con 0,01 ml de medio; 2, suspensión de espermatozoides; 3, menisco de suspensión; 4, pajuela de 0,5 ml; 5, sellado con calor; 6, marca sobre la pajuela; 7, tubo para descongelar; 8, medio de descongelación.

sérica humana, Sigma, St Lois, EE. UU.) al 1% y se incubó al menos 45 min a 37°C. Finalmente, se procedió a retirar cuidadosamente el sobrenadante y depositarlo en un tubo Falcon estéril.

Vitrificación y desvitrificación de las muestras

Vitrificación

Los espermatozoides seleccionados por *swim-up* fueron vitrificados, para lo cual, en un tubo eppendorf se depositaron 200 µl de HTF con 1% HSA que contenían aproximadamente 1-1,5 millones de espermatozoides. Posteriormente se adicionaron 200 µl de medio Vitrisperm® y se dejó equilibrar la solución durante 5 min. Se vitrifican volúmenes de 100 µl que contienen $1,5 \times 10^6$ espermatozoides que se colocan en pajuelas de 0,25 ml y cada una se introduce en otra pajuela de 0,5 ml que es sellada con calor (fig. 1). Posteriormente las pajuelas se sumergen en N₂L durante 5 s, se guardan en la porta-pajuelas y se almacenan en N₂L para su conservación.

Desvitrificación

Las pajuelas se cortan en uno de sus extremos y se coloca el contenido de hasta 3 pajuelas en un tubo Falcon que contiene 6 ml de HTF + HSA 1% a 37°C (en baño de agua a 37°C) para su descongelación. Luego se equilibra la solución que contiene los espermatozoides durante 5 min a 37°C en estufa de cultivo, se realiza una centrifugación



Figura 2 Ecografía 3D con morfología fetal normal en embarazo de 31 semanas de evolución fisiológica.

a 1.800rpm durante 5 min y el pellet es resuspendido en 0,5 ml de HTF-HSA 1%. Las muestras post desvitrificación utilizadas para la IUI presentaron una concentración de $3,0 \times 10^6$ espermatozoides/ml, motilidad mayor de 60% y fragmentación del ADN menor al 10%.

Estimulación ovárica y evolución del embarazo

Se realizó estimulación ovárica con letrozol (Femara, Novartis, Chile), 5 mg durante 5 días (3-7 días del ciclo), con posterior seguimiento ecográfico. Al obtener un folículo de 20 mm se administraron 5.000 UI de hCG (Gonacor, Ferring, Chile) y después de 36 h se realizó la IUI.

Dieciséis días después de la inseminación la paciente presentó una βhCG positiva, y en la quinta semana de gestación, mediante ecografía transvaginal, se confirmó la presencia de un embarazo intrauterino. La evolución de un desarrollo fetal normal fue confirmada y controlada por ecografía 3D (fig. 2), con el posterior nacimiento por parto cesárea de un recién vivo de 3.849 g, de sexo masculino, Apgar 9 al minuto, 10 a los 5 min y un examen físico dentro de los límites normales.

Discusión

La vitrificación es una forma de criopreservación ultrarrápida, posible de ser utilizada en la preservación de gametos para reproducción asistida. Este tipo de criopreservación consiste en elevar la viscosidad de los líquidos intra y extracelulares deteniendo finalmente todos los procesos celulares⁶. Una de las ventajas de la vitrificación es evitar la formación de cristales de hielo intracitoplasmáticos, los cuales inducen daño y pérdida de la función celular; estos son el principal obstáculo que presenta la criopreservación tradicional, razón por lo cual la vitrificación

se ha planteado como una solución a la criopreservación lenta^{7,8}.

La congelación y descongelación no parecen ser inoportunas para los espermatozoides, y transcurrido el tiempo la movilidad de estos, al igual que la viabilidad y la integridad del ADN, pueden presentar una evidente disminución desde el momento en que son descongelados^{3,4}. De ahí la importancia de disminuir el tiempo de tratamiento post descongelación, tanto por la presencia de crioprotectores —que también son tóxicos para la célula— como por las múltiples centrifugaciones, que incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno^{9,10}. Todas estas situaciones ocurren cuando se congela semen, y consecuentemente las muestras descongeladas deben ser tratadas para eliminar el plasma seminal y los crioprotectores. En cambio, en la vitrificación no se utilizan crioprotectores permeables y los espermatozoides son obtenidos por métodos de selección espermática, lo que garantiza una alta motilidad, y al estar desprovistos de plasma seminal disminuye el riesgo de transmisión de infecciones virales, *Mollicutes* o bacterias. El espermatozoide libre de plasma seminal y con función conservada puede ser utilizado de inmediato tras la descongelación para cualquier técnica de medicina reproductiva, en volúmenes pequeños (1-5 µl) para fecundación *in vitro* convencional e ICSI⁷⁻¹¹, o en volúmenes mayores para IIU (100 a 500 µl)⁸. Este nuevo método otorga a pacientes oligoastenozoospermicos severos una alternativa terapéutica de bajo coste, previo a las técnicas de fecundación *in vitro*, ya que permite almacenar espermatozoides seleccionados hasta obtener la concentración mínima para realizar ciclos de IIU¹². Esta concentración mínima de $3,0 \times 10^6$ espermatozoides/ml, pero con movilidad y función altamente conservadas, nos ha posibilitado lograr embarazos viables y que llegaron a término con recién nacidos sanos¹. Esto a su vez permitirá que futuros estudios evalúen la concentración mínima para lograr el embarazo en muestras vitrificadas, especialmente en semen de donante, ya que podrían incrementar el número de pajuelas obtenidas por donante de semen, lo que, junto con la rapidez y la simplicidad de esta metodología, puede hacer disminuir ostensiblemente su coste, permitiendo a un mayor número de parejas la posibilidad de acceder a estos procedimientos, especialmente en países que no cuentan con cobertura económica de salud para realizar tratamientos de medicina reproductiva.

Responsabilidades éticas

Derecho a la privacidad y consentimiento informado.

Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor para correspondencia.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes y que todos los pacientes incluidos en el estudio han recibido información suficiente y han dado su consentimiento informado por escrito para participar en dicho estudio.

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Financiación

Universidad de la Frontera.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Sanchez R, Isachenko V, Petrunkina AM, Risopatron J, Schulz M, Isachenko E. Live birth after intrauterine insemination with spermatozoa from an oligoasthenozoospermic patient vitrified without permeable cryoprotectants. *J Androl.* 2012;33:559–62.
2. Albarracín L. Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica open pulled straw: Estudio estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario *in Vitro* [tesis doctoral]. Barcelona: Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona; 2005.
3. Hammadeh ME, Askari AS, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl.* 1999;22:155–62.
4. Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schondorf T, Mallmann P, et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod.* 2004;19:932–9.
5. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 1991;88:11003–6.
6. Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Dessole S, Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod Biomed Online.* 2003;6:191–200.
7. Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, Sterzik K, Mallmann P, Rahimi G, et al. Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: New capillary technology. *J Androl.* 2012;33:462–8.
8. Isachenko V, Maettner R, Petrunkina A, Mallmann P, Rahimi G, Sterzik K, et al. Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in large (to 0.5 mL) volume: Novel technology. *Clin Lab J.* 2011;57:643–50.
9. Aitken RJ, de Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 2010;16:3–13.
10. Toro E, Fernández S, Colomar A, Casanovas A, Alvarez JG, López-Teijón M, et al. Processing of semen can result in increased sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril.* 2009;92:2109–12.
11. Isachenko V, Isachenko E, Petrunkina A, Sanchez R. Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies. *Reprod Fert Develop.* 2012;24:323–6.
12. Sánchez R, Risopatrón J, Schulz M, Villegas JV, Isachenko V, Isachenko E. Vitrified sperm banks: the new aseptic technique for human spermatozoa allows cryopreservation at -86°C . *Andrologia.* 2012;44:433–5.