

Acta Médica

Grupo Ángeles

Volumen
Volume **1**

Número
Number **3**

Julio-Septiembre
July-September **2003**

Artículo:

Criopreservación espermática, impacto sobre la tasa de sobrevida y su repercusión al futuro

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Grupo Ángeles Servicios de Salud

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com



Criopreservación espermática, impacto sobre la tasa de sobrevivencia y su repercusión al futuro

Alfredo Góngora,* Gabriela Capilla,** Patricia Trejo**

Resumen

Objetivo: Comparar las tasas de sobrevivencia en pacientes que criopreservaron muestras espermáticas con menos de cinco años contra muestras de pacientes con más de 5 años de congelación, y determinar si había daños aparentes.

Material y métodos: Se evaluaron 100 muestras al azar de semen humano que fueron obtenidas para análisis y proceso de congelación. Posterior a la descongelación la evaluación se llevó de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS). El líquido seminal permaneció en baño María a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por un tiempo no mayor de 20 minutos; a continuación se llevó la evaluación microscópica y se determinó la sobrevivencia espermática de las muestras con menos y más de cinco años de almacenamiento.

Resultados: Se encontró que una muestra espermática sumergida en nitrógeno líquido, sufre un deterioro de su movilidad. No todos los individuos poseen espermatozoides que puedan ser criopreservados efectivamente. Se llevó a cabo la estimación puntual de la diferencia entre las proporciones de las poblaciones con un intervalo de confianza del 95% encontrando una diferencia no significativa entre $p = 0.2$ y 0.12 . Puede esperarse que la mayoría de las muestras de semen tengan una reducción en la movilidad durante el proceso de criopreservación, aunque la mayoría de esta pérdida está basa-

Summary

Introduction: The present work consisted of comparisons of the ratio of survival for two cryopreservation pool samples: a pool with < 5 years of cryopreservation and a pool with > 5 years of cryopreservation, to evaluate whether there was any apparent damage in the spermatic cells.

Methods: We analyzed 100 samples of human seminal liquid obtained for cryopreservation. Evaluation was carried out according to World Organization Health criteria (WHO). Samples were thawed in a water bath at $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 20 min; subsequently, we carried out a microscopic evaluation for the two types of samples.

Results: We found that the more time that a spermatic sample is maintained under liquid nitrogen, the more damage and less motility of sperm cells occurs. We made an estimation of the difference between the two populations with a 95% confidence intervals and found a true but not significant difference ($p = 0.2-0.12$). We can assume that the majority of cryopreserved sperm samples will have a reduction in mobility during the cryopreservation process, even though the majority is based on individual differences.

This has led to development and use of cryoprotectors with extenders to control alterations in cells and solvents to obtain samples with better quality and longer storage time. The difference is minimum in motility; however the

* Director Médico. Centro de Fertilidad Humana.

** Laboratorio de Criopreservación.

Correspondencia:

Dr. Alfredo Góngora Rodríguez
Centro de Fertilidad Humana. Tuxpan 6-4 piso
Col. Roma C.P. 06760 México, D.F.
Correo electrónico: dr_gongora@hotmail.com

Aceptado: 07-08-2003.

da en diferencias individuales. Esto ha llevado a desarrollar uso de crioprotectores con extensores para controlar alteraciones en los solventes y solutos, intra y extracelular, y así obtener muestras con mejor calidad y mayor tiempo de almacenamiento. La diferencia es aparentemente mínima en cuanto a movilidad se refiere, ya que siguen siendo muestras con características aptas para ser utilizadas en técnicas de reproducción asistida. Así mismo, la cantidad de espermatozoides móviles recuperados sugieren buenos resultados: muestras con conteos de espermatozoides arriba de 10 millones/mL.

Palabras clave: Criopreservación, crioprotectores.

amount of motile sperms suggests good results, i.e. samples with sperm counts above 10 millions/mL.

Key words: Cryopreservation, cryoprotectors.

OBJETIVO

Demostrar cómo en los pacientes que criopreservan muestras de espermatozoides, conservan tasas de sobrevivencia del 50% en períodos por arriba de los cinco años de almacenamiento sin riesgos apreciables de daño espermático.

INTRODUCCIÓN

La evolución de la criobiología ha conseguido establecer procedimientos razonablemente eficaces para la criopreservación de espermatozoides humanos, sin embargo los efectos de la congelación y la descongelación siguen siendo letales.¹

Son poco conocidos los eventos físicos y bioquímicos que ocurren durante la congelación, almacenamiento y descongelación en el espermatozoide, así como los métodos para detectar los daños criogénicos. Es de este modo como las células sobrevivientes pueden sufrir lesiones estructurales y cambios metabólicos que limitan su función biológica. Dichos efectos ocurren incluso si el periodo de congelación es muy corto, por lo que resultan inevitables.

El objetivo de cualquier protocolo de congelación es prevenir la formación letal de cristales de hielo intracelular, controlar grandes fluctuaciones en su volumen y reducir el daño de la membrana que acompaña los cambios de fase inducidos por las bajas temperaturas. También es bien conocido que si un espécimen de semen tiene una capacidad baja de fertilización antes de congelar, la capacidad no será mejor al descongelar dicha muestra.

Intentos para maximizar la sobrevivencia de los espermatozoides frente a su descongelación, han llevado al desarrollo de crioprotectores con extensores para controlar alteraciones en los solventes y solutos intra y extracelular.

lar; así como obtener muestras con mejor calidad y mayor tiempo de almacenamiento.²

Existen diversas legislaciones como deben citarse la española (artículo 11 de la Ley 35/1988) y la inglesa (1990), que contemplan limitaciones temporales para la conservación del semen a cinco años. Los estudios realizados desde el inicio de la conservación de espermatozoides, no muestran alteraciones cromosómicas tras la criopreservación. Dada la baja incidencia de los fenómenos que pudieran lesionar el material genético, se ha calculado que los espermatozoides podrían conservarse durante muchos años sin riesgo apreciable de mutaciones.³ Por otra parte, es importante mencionar que existe un porcentaje elevado de personas menores de 20 años o sin pareja, que tienen depositado su semen en Bancos y no es posible plantear su descendencia en este periodo de vida.⁴

Así mismo, se pretende demostrar que en centros de reproducción humana, un porcentaje alto de pacientes con muestras normales de espermatozoides obtendrán altas posibilidades de almacenamiento exitoso con más de 5 años de conservación, protegiendo así su fertilidad futura.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron al azar 100样的 de semen humano en pacientes con edades entre 20 y 35 años que fueron obtenidas para análisis y proceso de congelación. Mediante el método de recolección convencional (masturbación) fueron obtenidas las muestras de esperma en un frasco estéril de plástico previa abstinencia sexual de 3 a 5 días. Posteriormente se llevó a cabo el análisis macroscópico y microscópico fundamentado en los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (*Cuadro I*).⁵

A los espermatozoides previa eliminación del plasma seminal, fueron expuestos al crioprotector (Irvine Scienti-

Cuadro I. Criterios de la OMS (1999).

Volumen	2.0 mL o más
PH	7.2 o más
Concentración espermática	20×10^6 espermatozoides/mL o más
Numero total de espermatozoides	40×10^6 espermatozoides por eyaculado o más
Motilidad	50% o más con progresión anterógrada (categorías a y b), o 25%, o más con progresión lineal rápida (categoría a) dentro de los 60 minutos de la eyaculación
Morfología	Actualmente se están desarrollando estudios multicéntricos de poblaciones para proponer una mejor evaluación de este parámetro. Datos obtenidos de Programas de Reproducción Asistida sugieren que cuando la morfología baja del 15% de formas normales la tasa de fertilización <i>in vitro</i> disminuye.
Viabilidad	50% vivos o más, por ejemplo excluyendo el colorante
Leucocitos	Menos de 1×10^6
Prueba de Immunobeads	Menos del 50% de espermatozoides móviles con partículas adheridas
Prueba MAR	Menos del 50% de espermatozoides con partículas adheridas

(Datos de espermatobioscopia inicial de la población)

fic, Santa Ana, CA; TEST Yolk Buffer con 7.4% de glicerol, fructosa o glucosa y lípidos adicionado con sulfato de gentamicina).

La selección de un crioprotector para conservar en las mejores condiciones posibles al esperma, que estará bajo esta terapia, estuvo basado en las habilidades para mantener la integridad celular y funcional durante el proceso de congelación y descongelación.

TÉCNICA DE CRIOPRESERVACIÓN ESPERMÁTICA

Posterior a la eliminación del plasma seminal es adicionado gota a gota el crioprotector (Irvine Scientific, Santa Ana, CA; TEST Yolk suplementado con glicerol 7.4 %). Períódicamente, y cada 10 minutos, se repitió la misma técnica combinando la muestra seminal hasta obtener el efecto deseado. Una vez obtenido el volumen, las muestras espermáticas analizadas se dejan a temperatura ambiente por un lapso de 10 a 15 minutos; a continuación son expuestas a vapor en nitrógeno líquido por un tiempo de 30 minutos, llevándose a continuación la inmersión en este gas.

PROCEDIMIENTO DE DESCONGELACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras espermáticas permanecieron en un tanque seco con nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C. Las muestras seleccionadas fueron expuestas durante 10 segundos a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$); posteriormente se sumergieron en un baño María a temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por un lapso de 15 a 20 minutos.

Cada muestra fue mezclada perfectamente con una pipeta estéril y se colocaron 10 uL en la cámara Makler.

Se esperó de 2 a 3 minutos para estabilizar la temperatura y poder realizar la lectura del conteo espermático, así como para valorar la movilidad.

RESULTADOS

Se llevó a cabo la evaluación de las alícuotas al azar de semen para sus correspondientes tasas de sobrevivencia desde 1989 al 2003. Todos los pacientes que se consideraron para el estudio fueron muestras con conteos de espermatozoides, porcentaje de movilidad y progresiones normales (basados en el Manual de la OMS);⁵ descartándose las muestras con presencia de oligozoospermia y astenozoospermia. La media de edad (25 años) que se abarcó fue determinado por la afluencia de pacientes que acudieron a la clínica.

Se realizó la diferencia entre las proporciones de dos poblaciones aplicando el teorema del límite central con un intervalo de confianza del 95%.⁶ De cada grupo (menor y mayor de cinco años de criopreservación) se tomó el porcentaje de tasa de sobrevivencia de personas mayor a 50% de movilidad. De las 50 muestras analizadas con arriba de 5 años de criopreservación resultó un 76% de tasa de supervivencia que tuvieron más del 50% de movilidad. Mientras que en las siguientes 50, por debajo de 5 años de criopreservación, el porcentaje resultó del 80% que tuvieron una movilidad mayor al 50%.

La estimación puntual de la diferencia entre las proporciones de las poblaciones por el teorema del límite central, fue de $0.76 - 0.80 = -0.04$ con el 95% de confianza de que la diferencia verdadera está entre $p = 0.2$ y 0.12 .

Finalmente, de las 100 alícuotas, se determinaron sus valores promedio para dar a conocer los rangos de cali-

dad de muestras que se seleccionaron para el análisis (valor promedio de espermatozoides móviles de 53 millones/mL) (*Cuadros II y III*).

DISCUSIÓN

El éxito de la sobrevivencia a la descongelación de una muestra espermática está ligada a la calidad de la misma.⁷ Muestras espermáticas en número normal, en cuanto a movilidad y porcentaje de movilidad (> 50%), tuvieron buenos resultados quedando muestras con arriba de 10 millones de espermatozoides por mililitro (*Cuadro III*).

Al llevar a cabo la diferencia entre las proporciones de las dos poblaciones encontramos que los valores reflejan que el análisis comparativo fue el siguiente.

El valor que disminuyó fue la movilidad espermática, bajando una escala de progresión a b. A pesar de la aparente diferencia de movilidades, las muestras post-descongeladas lograron mantener valores permisibles que permiten ser manejadas para técnicas de reproducción

asistida dando un valor real no significativo; ya que el 76% de los pacientes con más de cinco años de criopreservación mantuvieron una tasa igual o por arriba del 50% de sobrevida. Una movilidad de tipo b, sugieren que al llevar a cabo una técnica de selección y lavado como podría ser un swim-up la muestra podría alcanzar un mejor estado, o en su defecto se considera una muestra apta (*Cuadro I*). La congelación es un proceso complejo en el que intervienen muchos factores como son la velocidad de enfriamiento, la presión, la composición, entre otros. Los mecanismos por los cuales actúa el crioprotector no han sido completamente conocidos.

Es importante manejar una temperatura homogénea para la recuperación de la célula que lleva aparejado el paso inverso de la congelación. En función de la velocidad a la que se realiza la congelación, el material está expuesto a ciertos riesgos durante la descongelación y por lo tanto a las características finales de funcionalidad de la célula.⁸

A pesar de las ventajas de la criobiología en el área andrológica, no todos los individuos poseen espermatozoides que pueden ser criopreservados efectivamente. La observación y trabajo de los investigadores han demostrado una baja movilidad en el descongelamiento de la muestra en algunos pacientes; el análisis total de descongelamiento debe ser realizado a todas las muestras espermáticas para determinar si son o no adecuadas para un almacenamiento a largo plazo.⁸ Puede esperarse que la mayoría de las muestras de semen tengan una reducción en la movilidad durante el proceso de crioconservación, aunque la mayoría de esta pérdida está basada en diferencias individuales.

Finalmente, los datos indican que las células espermáticas almacenadas durante largo tiempo no reducen su capacidad fertilizante,⁹ teniendo así un porcentaje pequeño de posible pérdida de criosobrevivencia después de 25 años de almacenamiento a -196°C.

En resumen, la aplicación clínica de la criopreservación del semen ha demostrado ser un método probado y efectivo en el tratamiento de aquellos individuos preocupados por el impedimento de la fertilidad.¹⁰

A pesar del importante uso de los crioprotectores en el semen humano, son poco conocidos los eventos físicos y bioquímicos que ocurren durante la congelación, almacenamiento y descongelación del esperma humano, o bien acerca de los métodos para detectar los daños criogénicos.¹¹

Las muestras espermáticas y su relación con la sobrevida es baja con respecto a protocolos actuales de criopreservación, ya que dado los esfuerzos para obtener mejores resultados se siguen obteniendo muestras descongeladas con disminución de la movilidad de las que

Cuadro II.		
Parámetros (x)	Muestras con menos de 5 años de criopreservación	Muestras con más de 5 años de criopreservación
Concentración (millón/mL)	67	64
Esporas móviles (millón/mL)	49	39
% de movilidad	60	61
Nivel de movilidad	a, b	a, b

Cuadro III. Valores promedios postdescongelación.		
Parámetros (x)	Muestras con menos de 5 años de criopreservación	Muestras con más de 5 años de criopreservación
Número de pacientes	50	50
Concentración (millón/mL)	71	76
Esporas móviles (millón/mL)	36	26
% de movilidad	51	34
Nivel de movilidad	b, a	B

son obtenidas en fresco. Podemos mencionar que hay criterios que sugieren una pérdida anual del 2% en la movilidad espermática, sin embargo nosotros no estamos convencidos.

REFERENCIAS

1. Larson JM, McKinney KA, Mixon BA, Burry KA, Wolf DP. *An IUI-ready cryopreservation method compared with sperm recovery after conventional freezing and post thaw processing*. Presented at the 5th Annual Meeting of the American Society of Reproductive Medicine. Washington, D.C., USA. October 1995. Department of Obstetrics/Gynecology, Oregon Health Sciences University, USA.
2. Rothmann R. What is sperm banking? When and how is it (or should it be) used in humans? Animals? *American Society of Andrology, Handbook of andrology*. Baltimore, MD, USA: ASA; 1995: 456.
3. Informe Anual de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida. *Criopreservación de semen*. Valencia, Spain: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2003: 892.
4. García C, Galán C. Límite temporal de crioconservación de gametos. *Aspectos éticos-legales*. Doctrina. Valladolid, Spain: Comares; 2003.
5. *Manual de laboratorio de la OMS para examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*. 4^a ed. Madrid, Spain: Panamericana; 1999: 74.
6. Daniel WW. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. 3^a ed. México, D.F.: Limusa; 1990: 186-187.
7. Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Critser JK. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Human Reprod* 1997; 12: 112-118.
8. Clarke GN. Sperm cryopreservation: is there a significant risk of cross contamination? *Human Reprod* 1999; 941-2943.
9. Avery SM, McLaughlin EA, Dawson KJ. (1998) Safe cryopreservation of sperm and embryos. *Human Fertil* 1998: 84-86
10. Barratt CL, Clements S, Kessopoulou E. Semen characteristics and fertility tests required for storage of spermatozoa. *Human Reprod* 1998; (13 Suppl. 2): 1-11.
11. Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improve the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate. *Human Reprod* 1998; 13: 3384-3389.

