



## Efecto de la criopreservación espermática en muestras seminales de hombres fértiles e infériles\*

Armando Juárez Bengoa,\*,\*\* Xóchitl Elena Flores Escobar,\* Nubia Monserrat Serrano Macedo,\* Eduardo Cruz Rivera,\*\*\* Guillermo Castellanos Barroso,\*\*\* Rodrigo Vega Sánchez\*\*\*\*

### RESUMEN

**Antecedentes:** la criopreservación permite conservar células espermáticas durante un tiempo indefinido hasta el momento de utilizarlas. Sin embargo, el proceso puede lesionarlas o, incluso, matarlas por los cambios térmicos.

**Objetivo:** comparar la recuperación espermática de muestras seminales de hombres fértiles e infériles después de un proceso de criopreservación.

**Material y método:** estudio prospectivo, observacional y transversal en el que durante dos semanas se criopreservaron las muestras seminales de 25 hombres fértiles y 13 de pacientes infériles. Se compararon: la concentración, movilidad, morfología espermáticas y total de células móviles antes y después de la congelación. Las muestras de hombres fértiles se dividieron en: 12 con parámetros seminales normales y 13 con parámetros seminales alterados. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney y se consideró significativo el valor de  $p<0.05$ .

**Resultados:** la movilidad inicial de 65.12 disminuyó a 42.08% y, del total de células móviles de 123.37 millones a 62.05 millones en las muestras de hombres fértiles. En los infériles, la movilidad cambió de 53.38 a 7.08% y, total de células móviles, de 64.57 millones a 11.76 millones. En los hombres fértiles con factores alterados, el total de células móviles es comparable con el de los infériles; sin embargo, la recuperación espermática fue mucho mayor. La recuperación de las muestras seminales congeladas es, aproximadamente, de 50% en los hombres fértiles, pero de sólo 15% en las de los hombres infériles.

**Conclusiones:** para decidir el número de muestras a congelar es importante considerar la pérdida espermática.

**Palabras clave:** criopreservación, semen, infertilidad, reproducción.

### ABSTRACT

**Background:** Cryopreservation permits to keep sperm cells for undefined time until the moment to be used. However, the process can damage them or even to kill them because of thermal changes.

**Objective:** Comparing sperm recovery of semen samples of fertile and infertile men after being subjected to a process of cryopreservation.

**Method:** Semen samples of 25 fertile men and 13 of infertile men were frozen by two weeks. Sperm concentration, mobility and morphology, as well as total of mobile cells (TCM) were compared before and after cryopreservation. Semen samples of fertile men were divided in 12 with normal semen values (FPN) and 13 with altered semen values (FPA). Mann-Whitney U test was used considering significant  $p<0.05$ .

**Results:** There was a drop of mobility from 65.12% to 42.08% and TCM from 123.37 million to 62.05 million in samples of fertile men. In infertile men the mobility changed from 53.38% to 7.08% and TCM from 64.57 million to 11.75 million. In fertile men with altered values TCM is comparable to that of infertile men, but sperm recovery was much higher.

Recovery of frozen semen samples is about 50%, but only 15% in those of infertile men.

**Conclusions:** It is important to consider sperm loss for deciding the number of semen samples to be frozen.

**Key words:** Cryopreservation, semen, infertility, reproduction

### RÉSUMÉ

**Antécédents:** La cryoconservation permet de conserver les spermatozoïdes pour une durée indéterminée jusqu'à son utilisation. Toutefois, le processus peut blesser ou même tuer par des changements thermiques.

**Objectif:** Comparer la récupération des échantillons de sperme de sperme des hommes fertiles et infertiles après le processus de cryoconservation.

**Matériel et méthodes:** le manque de méthodes pour deux semaines ont été cryoconservés échantillons de sperme de 25 hommes fertiles et 13 patients infertiles. Ont été comparés: des cellules de la concentration, la motilité, la morphologie et le total de spermatozoïdes mobiles avant et après la congélation. Les échantillons d'hommes fertiles ont été divisés en 12 avec les paramètres du sperme normal et 13 avec les paramètres du sperme altéré. U a utilisé le test de Mann-Whitney test et considéré comme une valeur  $p$  significative  $<0.05$ .

**Résultats:** la mobilité a diminué à 42,08% et 65,12 de la cellule mobile total de 123,37 à 62,05 millions de dollars en les échantillons d'hommes fertiles. Dans le infertiles, la mobilité a changé à 7,08% et 53,38, le total des cellules mobiles de 64,57 à 11,76 millions d'euros. Chez les hommes fertiles avec des facteurs modifiés, le total des cellules mobiles est comparable à celle de l'infertilité, cependant, la

récupération des spermatozoïdes a été beaucoup plus élevé. La récupération des échantillons de sperme congelé est d'environ 50% des hommes fertiles, mais seulement 15% chez les hommes infertiles.

Conclusions: Pour déterminer le nombre d'échantillons est important de considérer la perte de congeler le sperme.

**Mots-clés:** cryoconservation, le sperme, l'infertilité, la reproduction.

## RESUMO

**Antecedentes** Criopreservação permite reter as células de esperma por tempo indeterminado até a sua utilização. No entanto, o processo pode ferir ou até mesmo matá-los por variações térmicas.

**Objetivo:** Comparar a recuperação dos homens de sêmen amostras de esperma férteis e inférteis após o processo de criopreservação.

**Material e métodos:** a falta de métodos para duas semanas foram criopreservados amostras de sêmen de 25 homens férteis e 13 pacientes inférteis. Foram comparados: a concentração, motilidade, morfologia e total de espermatozoides móveis antes e após o congelamento.

As amostras de homens férteis foram divididos em 12 com parâmetros seminais normais e 13 com parâmetros seminais alterados. U foi utilizado o teste Mann-Whitney e considerado valor  $p < 0,05$ .

**Resultados:** diminuição da mobilidade para 42,08% e 65,12 do total de células móveis de 123,37-62050000 nas amostras de homens férteis. No inférteis, mobilidade alterada para 7,08% e 53,38, o total de células móveis 64,57-11,76 milhões. Em homens férteis com fatores alterados, total células móveis é comparável com a dos inférteis, no entanto, a recuperação de espermatozoides era muito maior. A recuperação de amostras de sêmen congelado é de aproximadamente 50% dos homens férteis, mas apenas 15% em homens inférteis.

**Conclusões:** Para determinar o número de amostras é importante considerar a perda de esperma de congelamento.

**Palavras-chave:** criopreservação, sêmen, infertilidade, reprodução.

**L**a primera observación, que señala que la movilidad de los espermatozoides humanos puede recuperarse después de la congelación y descongelación, se realizó en 1776.<sup>1</sup> Noventa años después surgió la idea de la probable congelación de semen de los soldados que iban a la guerra, con el propósito de permitir que sus esposas lograran un embarazo en caso de un desenlace adverso.<sup>2</sup> En las décadas de 1930 y 1940 se observó que los espermatozoides podían sobrevivir a temperaturas menores de -160°C y, tiempo después, se dio a conocer la consecución

de embarazos humanos mediante inseminación artificial utilizando espermatozoides previamente congelados.<sup>3</sup> Posteriormente, se utilizó nitrógeno líquido (-196 °C) para la criopreservación de semen que luego permitiera lograr embarazos por inseminación artificial.<sup>4</sup>

La refrigeración inicial a una temperatura de 0°C disminuye el metabolismo celular interrumpiendo rápidamente el transporte iónico, lo que origina una fase de transición de los lípidos en la membrana del espermatozoide.<sup>5,6</sup> Con frecuencia, esta interrupción no daña la célula si el medio de cultivo está osmóticamente equilibrado. Sin embargo, a temperaturas de 0°C a -20°C comienzan a formarse cristales de hielo en el espacio extracelular, circunstancia que incrementa la concentración de solutos del medio. Como resultado, las moléculas de agua salen de la célula hacia el espacio extracelular, lo que ocasiona deshidratación y contracción celular. Cuando el proceso de refrigeración ocurre rápidamente se forman cristales de hielo intracelular que alteran los organelos y la membrana celular, lo que a su vez origina la muerte celular durante el proceso de descongelación.<sup>5</sup>

El estrés físico de la contracción celular puede causar la pérdida irreversible de la membrana y la alteración del citoesqueleto y de los organelos. La célula puede verse afectada por las altas concentraciones de solutos en las partes no congeladas del espacio extracelular que dañan la membrana, por cambios en el pH y desnaturización de proteínas. Sin embargo, cuando la refrigeración es gradual,

• La FEMECOG otorgó a este trabajo el segundo lugar del Premio Dr. Alfonso Alvarez Bravo en la categoría de investigación básica del concurso celebrado durante el 62 Congreso Mexicano de Ginecología que tuvo lugar en el puerto de Veracruz el pasado octubre de 2011.

\* Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Coordinación de Andrología.

\*\* Médico especialista. Hospital General de Zona número 53, IMSS.

\*\*\* Médico residente de Biología de la Reproducción Humana.

\*\*\*\* Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Departamento de Investigación en Nutrición. México, DF

Correspondencia: Dr. Armando Juárez Bengoa. Instituto Nacional de Perinatología. Montes Urales 800, colonia Lomas de Virreyes. México 11000, DF. Correo electrónico: ajuarezbengoa@yahoo.com.mx

Este artículo debe citarse como: Juárez-Bengoa A, Flores-Escobar XE, Serrano-Macedo NM, Cruz-Rivera E, Castellanos-Barroso G, Vega-Sánchez R. Recuperación espermática después de la criopreservación de muestras seminales de hombres fériles e infériles. Ginecol Obstet Mex 2012;80(1):8-15.

suficiente para prevenir la formación de hielo intracelular pero suficientemente rápida para evitar los efectos de la deshidratación, las células pueden ser capaces de sobrevivir a los procesos de congelación y descongelación.<sup>5,6</sup> A una temperatura final de almacenamiento inferior a -130°C, el agua líquida no existe y la difusión es insignificante. El almacenamiento en nitrógeno líquido a -196°C previene las reacciones químicas.<sup>5</sup>

A las células se les agregan algunas sustancias, como glicerol o propanediol, como crioprotectores porque reducen las concentraciones de sal e incrementan la fracción de agua no congelada y, por lo tanto, reducen el estrés osmótico. El glicerol reemplaza el agua intracelular necesaria para mantener el volumen celular, interacciona con iones y macromoléculas y se reduce la formación de hielo intracelular.<sup>6,7</sup> Para la congelación, las muestras se dividen en partes iguales en varios recipientes, se suspenden en vapor de nitrógeno a -80°C durante 15 minutos, después se sumergen en nitrógeno líquido a -196°C y se almacenan hasta que son requeridas.<sup>8</sup>

Las indicaciones para el almacenamiento espermático incluyen todos los casos en los que hay un riesgo inminente de daño al sistema reproductivo masculino, como exposición a radioterapia o quimioterapia debido a enfermedades malignas o por cirugía testicular.<sup>9</sup> Otras indicaciones son: la criopreservación de semen de donador para uso futuro en técnicas de reproducción asistida, antes de algún tratamiento quirúrgico, como varicocelectomía en hombres con oligozoospermia severa para proTEGERLO de una posible azoospermia postoperatoria, en la recuperación espermática por azoospermia,<sup>7</sup> en pacientes cuyas muestras son difíciles de obtener o en quienes por cuestiones personales no van a estar presentes en el momento en que se requiere la muestra.

Sin el uso de un crioprotector, la supervivencia celular es muy baja. Aún con la adición de yema de huevo disminuye la cantidad de células recuperadas al descongelarlas.<sup>12</sup> Una estrategia para incrementar el número de espermatozoides móviles después del descongelamiento es obtener eyaculados una o dos veces por semana para que la acumulación de las muestras proporcione un número suficiente de espermatozoides.<sup>10</sup> Sin embargo, el proceso tiene un costo que se eleva mientras mayor sea el número de muestras a criopreservar. Es posible que al descongelar las muestras, la cantidad de células recuperadas sea insuficiente para llevar a cabo alguna de las técnicas reproductivas. El objetivo de

este trabajo es comparar la recuperación espermática de muestras seminales de hombres fértiles e infériles después de someterlas a un proceso de criopreservación.<sup>5</sup>

## MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo, observacional y transversal en el que durante dos semanas se criopreservaron las muestras seminales de 25 hombres con fertilidad probada, cuya pareja cursaba en ese momento con embarazo y 13 muestras seminales de pacientes infériles. Se midieron: el volumen, la concentración, movilidad y morfología espermáticas después de la congelación. Las muestras de hombres fértiles se dividieron en dos grupos: 12 con parámetros seminales normales y 13 con parámetros seminales alterados.

Las muestras se colectaron por masturbación, con un tiempo de abstinencia de 3 a 5 días, directamente en un envase de plástico estéril de boca ancha, en áreas especiales de la clínica. La muestra obtenida se conservó a temperatura de 37°C durante 30-45 minutos hasta el momento de su análisis.

El análisis seminal se efectuó de acuerdo con los criterios del Manual de la OMS 2010, en donde se analizaron parámetros macroscópicos (licuefacción, viscosidad, aspecto, volumen, pH) y microscópicos (concentración, movilidad, viabilidad y morfología).

Cada muestra se mezcló con el crioprotector (TYF-glicerol) volumen a volumen y se dejó a temperatura ambiente durante 25 a 30 minutos; posteriormente, a una temperatura de -4°C durante 15 minutos, después a -30°C otros 15 minutos, en vapores de nitrógeno 15 minutos más y finalmente se almacenó en nitrógeno líquido a -196°C. Para la descongelación, las muestras se retiraron del tanque de nitrógeno líquido, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se realizó nuevamente un análisis seminal.

Los resultados se compararon del análisis seminal antes y después de la congelación espermática, así como el porcentaje de células móviles recuperadas de los hombres fértiles e infériles. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney y se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

Puesto que el volumen se modifica cuando se agrega el crioprotector a la muestra seminal, se omitió la compara-

ción estadística de esta variable, aunque sí se dejó para el análisis la concentración espermática junto con las otras mediciones.

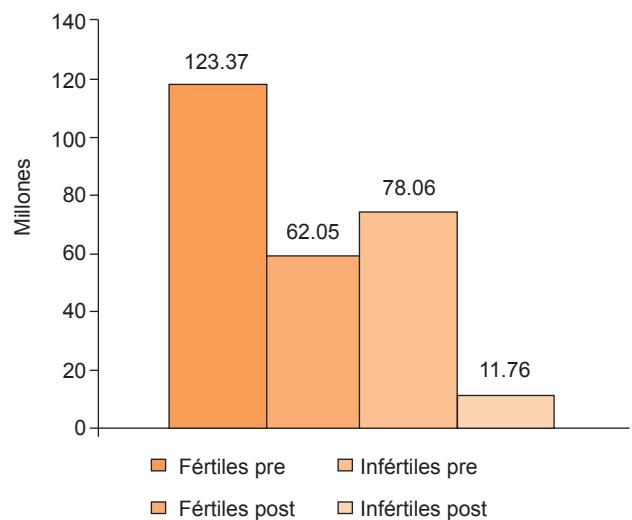
En los hombres fértiles la concentración fue de 107.88 millones/mL, la movilidad de 65.12% y morfología normal de 5.68%, respectivamente, antes de la criopreservación. En los hombres infértilles los valores respectivos fueron: 59.31 millones/mL, 53.38% y 3.31% (Cuadro 1).

Después de descongelar la muestra, la concentración, movilidad y morfología normal en los hombres fértiles fueron de 42.61 millones/mL, 42.08% y 3.72%, respectivamente. En los hombres infértilles fueron de 24.77 millones/mL, 7.08% y 2.31%, respectivamente (Cuadro 2).

En los hombres fértiles la concentración y la movilidad fueron estadísticamente diferentes antes y después de la congelación ( $p<0.05$ ), no así la morfología espermática ( $p>0.05$ ). En los hombres infértilles, la movilidad fue diferente ( $p<0.05$ ) antes y después de la congelación, sin diferencia en la concentración y la morfología espermáticas ( $p>0.05$ ).

El total de células móviles en los hombres fértiles fue de  $123.37 \pm 103.82$  millones y  $62.05 \pm 54.67$  millones antes y después de la congelación. Los valores en los hombres infértilles fueron  $78.06 \pm 64.57$  millones y  $11.76 \pm 14.51$  millones, respectivamente (Figura 1). Hubo una diferencia antes y después de la congelación en ambos grupos ( $p<0.05$ ).

En los hombres fértiles, el porcentaje de recuperación fue de 50.30%, en tanto que en los hombres infértilles fue de 15.07%, lo que significó una diferencia ( $p<0.05$ , Figura 2).



**Figura 1.** Total de células móviles en hombres fértiles e infértilles en las muestras seminales antes (pre) y después de la congelación (post). Antes y después de la congelación hubo diferencia estadística en ambos grupos. \* $p>0.05$

El grupo de hombres fértiles se dividió en dos. Un grupo se formó con quienes tenían parámetros normales de acuerdo con la OMS y otro grupo con los hombres cuyos valores seminales mostraron una alteración marcada en al menos uno de los parámetros analizados. La concentración, movilidad y morfología normal antes de la congelación fueron de 147.92 millones/mL, 69.33% y 8.67%, respectivamente, en los hombres con parámetros seminales normales. En los hombres con parámetros

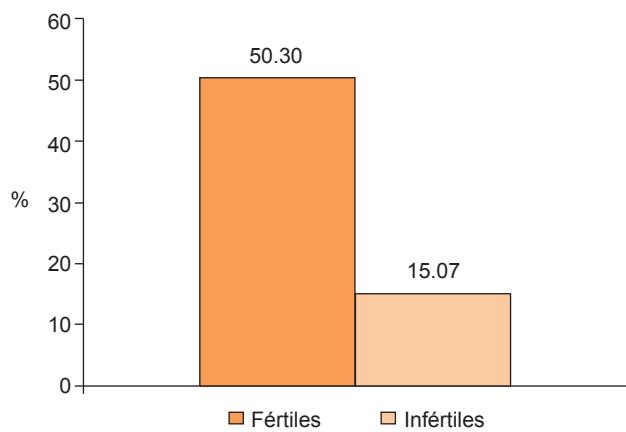
**Cuadro 1.** Valores seminales antes de la congelación. Los valores muestran medias  $\pm$  desviación estándar

Pre-criopreservación	Concentración (millones/mL)	Movilidad (%)	Morfología (%)
Fértiles (n=25)	$107.88 \pm 70.62$	$65.12 \pm 19.46$	$5.68 \pm 3.84$
Infértilles (n=13)	$59.31 \pm 49.87$	$53.38 \pm 19.43$	$3.31 \pm 2.23$

**Cuadro 2.** Valores seminales después de la congelación. Los valores muestran medias  $\pm$  desviación estándar

Post-criopreservación	Concentración (millones/mL)	Movilidad (%)	Morfología (%)
Fértiles (n=25)	$42.61 \pm 33.02^*$	$42.08 \pm 26.57^*$	$3.72 \pm 3.40$
Infértilles (n=13)	$24.77 \pm 16.43$	$7.08 \pm 12.64^*$	$2.31 \pm 0.76$

\*  $p<0.05$  respecto al valor antes de la congelación.



**Figura 2.** Porcentaje de recuperación del total de células móviles de hombres fértiles e infértilles en las muestras seminales después de haber sido descongeladas. \*P<0.05

seminales alterados, los valores respectivos fueron 70.92 millones/mL, 61.23% y 2.92%. (Cuadro 3)

Después de la descongelación de las muestras, la concentración, movilidad y morfología espermáticas normales fueron 48.93 millones/mL, 55.00% y 6.50%, respectivamente, en el grupo de hombres con parámetros seminales normales. En el grupo de hombres con parámetros seminales alterados los valores fueron, respectivamente, 36.77 millones/mL, 30.15% y 1.15%. (Cuadro 4).

En los hombres con parámetros seminales normales, la concentración mostró una diferencia antes y después de la congelación ( $p<0.05$ ), no así la movilidad ni la morfología ( $p<0.05$ ). En los hombres con parámetros seminales alterados hubo diferencia antes y después de la congelación en la concentración y en la movilidad ( $p<0.05$ ), pero no en la morfología ( $p>0.05$ ). La comparación entre los hombres con parámetros seminales alterados y los hombres infértilles no mostró diferencia en la concentración, movilidad ni morfología antes de la congelación, pero después de la congelación hubo diferencia en la movilidad y la morfología.

En los hombres con parámetros seminales normales el total de células móviles antes y después de la congelación fue de  $172.69 \pm 120.64$  millones y  $75.05 \pm 49.20$  millones, respectivamente. En los hombres con parámetros seminales alterados, los valores respectivos fueron  $77.85 \pm 54.56$  millones y  $46.65 \pm 45.38$  millones. En los hombres infértilles fueron  $78.06 \pm 64.57$  millones y  $11.76 \pm 14.51$  millones, respectivamente. En los tres grupos hubo una diferencia ( $p<0.05$ ) antes y después de la congelación (Figura 3). No hubo diferencia antes de la congelación en el total de células móviles de los hombres con parámetros seminales alterados y los hombres infértilles.

El porcentaje de recuperación espermática (porcentaje de células móviles recuperadas después de la congelación respecto al total de células móviles antes de la congelación)

**Cuadro 3.** Valores seminales antes de la congelación de muestras de hombres fértiles con parámetros seminales normales (FPN) y de hombres fértiles con parámetros seminales alterados (FPA). Los valores muestran medias  $\pm$  desviación estándar

Pre-criopreservación	Concentración (millones/mL)	Movilidad (%)	Morfología (%)
Fértiles FPN (n=12)	$147.92 \pm 80.28$	$69.33 \pm 13.70$	$8.67 \pm 3.47$
Fértiles FPA (n=13)	$70.92 \pm 28.23$	$61.23 \pm 22.87$	$2.92 \pm 1.21$

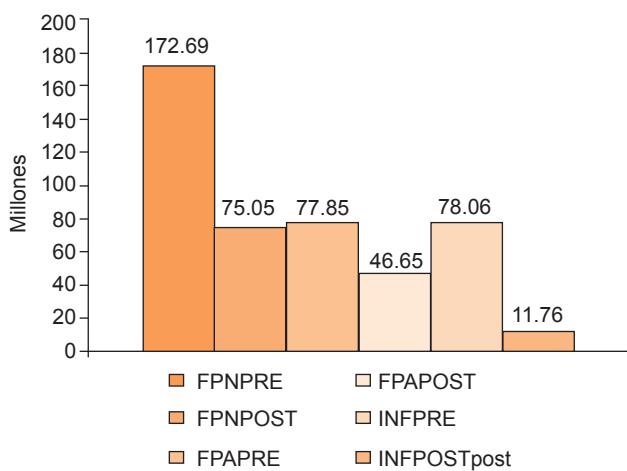
**Cuadro 4.** Valores seminales después de la congelación de muestras de hombres fértiles con parámetros seminales normales (FPN) y de muestras de hombres fértiles con parámetros seminales alterados (FPA)

Post-criopreservación	Concentración (millones/mL)	Movilidad (%)	Morfología (%)
Fértiles FPN (n=12)	$48.93 \pm 43.93$ *	$55.00 \pm 23.25$	$6.50 \pm 2.69$
Fértiles FPA (n=13)	$36.77 \pm 15.64$ *‡	$30.15 \pm 23.71$ *‡	$1.15 \pm 1.35$

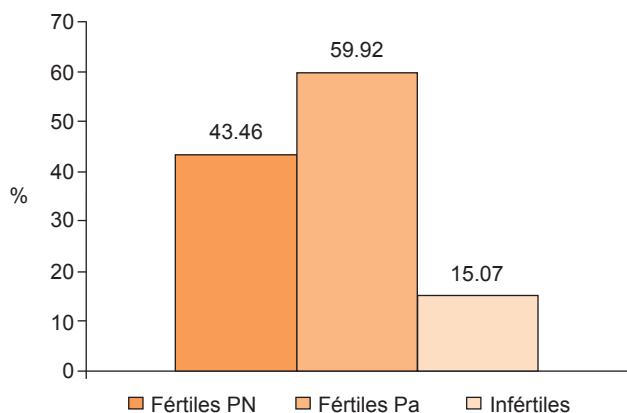
Los valores muestran medias  $\pm$  desviación estándar

\*  $p<0.05$  respecto al valor antes de la congelación. ‡  $p<0.05$  respecto a los parámetros después de la congelación de muestras de hombres infértilles.

en los hombres con parámetros seminales normales, con parámetros seminales alterados e infértils fue de 43.46%, 59.92% y 15.07%, respectivamente. No hubo diferencia entre parámetros seminales normales y con parámetros seminales alterados, pero sí la hubo entre los hombres infértils y los otros dos grupos (Figura 4).



**Figura 3.** Total de células móviles antes (pre) y después de la congelación (post) en muestras seminales de hombres fertiles con parámetros normales (FPN), fertiles con parámetros alterados (FPA) y hombres infértils (INF). Antes y después de la congelación hubo diferencia estadística (\* p<0.05)



**Figura 4.** Porcentaje de recuperación del total de células móviles de muestras congeladas y descongeladas de hombres fertiles con parámetros normales (PN), fertiles con parámetros alterados (PA) y hombres infértils. \* p<0.05

## DISCUSIÓN

La criopreservación de espermatozoides amplía las alternativas en la reproducción humana y ofrece la posibilidad de fertilidad en situaciones que, tiempo atrás, hubiera sido imposible, permitiendo la conservación de gametos de hombres que ven amenazada su fertilidad en forma temporal o permanente cuando existe la perspectiva de ser sometidos a tratamientos médicos, quirúrgicos o situacionales que potencialmente pueden deteriorar la disponibilidad de gametos. También ha permitido la conservación de muestras de donantes que se utilizan en parejas cuya afectación masculina es grave e irreversible.

Sin embargo, el proceso de congelación y descongelación daña a los espermatozoides y puede alterarlos funcionalmente o incluso matarlos, por lo que a pesar de que la criopreservación ha sido un gran avance, la aplicación de este proceso tiene limitaciones que no han sido resueltas.

En este estudio se observó una reducción en la concentración espermática de los hombres fertiles e infértils por efecto del proceso de congelación y descongelación, pero con diferencia estadística solamente en el grupo de los fertiles. Esto se explica por la desviación estándar (Cuadros 1 y 2) que refleja una amplia dispersión de valores en los hombres infértils. De cualquier forma, los resultados hablan de una reducción en este parámetro por efecto del procedimiento.

La movilidad también se redujo en ambos grupos, de 65 a 42% en los fertiles, pero en forma más marcada en las muestras de los hombres infértils, de 53 a 7%, lo que significa que hay algunas características en este grupo de pacientes que favorecen la pérdida de la movilidad por efecto del procedimiento. Otros grupos también han reportado disminución en la movilidad, de 29 a 12%,<sup>13</sup> de 43.4 a 14.1%<sup>14</sup> y de 39 a 16%.<sup>15</sup> Aunque hay diferencias en los porcentajes de la pérdida de movilidad, es un hecho que la tendencia en todos los estudios es la misma. En nuestro estudio hubo mayor reducción de la movilidad en el grupo de pacientes infértils.

Por lo que se refiere a la morfología no se observó un cambio significativo ni en el grupo de pacientes fertiles ni en el de los infértils, lo que significa que el proceso afecta poco este parámetro. Otros autores han observado el mismo fenómeno,<sup>15</sup> aunque en otros estudios se ha reportado una reducción en la cantidad de formas normales.<sup>13</sup> Esto

puede explicarse porque hay variantes en la metodología del proceso, porque se trata de poblaciones de pacientes diferentes y porque la evaluación de este parámetro está estrechamente vinculada con el adiestramiento del examinador.

Uno de los parámetros importantes es el total de células móviles, porque establece la cantidad de espermatozoides disponibles y esto a su vez sirve para tomar una decisión acerca de cuál es la técnica reproductiva a seguir, dado que a menor cantidad de espermatozoides disponibles, se deberá optar por una técnica reproductiva más compleja. En este estudio se observó una reducción importante en ambos grupos (Figura 1), de 123.37 millones a 62.05 millones en los hombres fértiles y de 78.06 millones a 11.76 millones en los hombres infértil. Lógicamente, esto se refleja en el porcentaje de recuperación, que fue mayor en los hombres fértiles que en los infértil, lo que mostró una diferencia importante en la recuperación (Figura 2).

La comparación de los parámetros seminales en los grupos de hombres fértiles con parámetros normales y con parámetros alterados mostró diferencias en la concentración espermática antes y después de la congelación, lo mismo que en la cantidad de células móviles (total de células móviles, Cuadros 3 y 4, Figura 3). Sin embargo, la movilidad sólo afectó en forma significativa al grupo de con parámetros seminales alterados, lo que habla de diferencias entre esos grupos a pesar de que se trata, en ambos casos, de hombres fértiles.

También es de destacar que si bien antes de la congelación no se observaron diferencias en concentración, movilidad, morfología y total de células móviles entre los hombres con parámetros seminales alterados y los hombres infértil (Cuadros 1 y 3, Figura 3), después del procedimiento hubo una reducción mucho mayor en la concentración, movilidad y total de células móviles de los hombres infértil. (Cuadros 2, 4, Figura 3) Esto sugiere que debe haber algunas características en las células de los hombres infértil que facilitan su pérdida durante el procedimiento. Las células espermáticas de los hombres fértiles, aún cuando se encuentren reducidos los valores seminales, deben tener características que les permiten mayor supervivencia al fenómeno de la congelación y la descongelación y esto no es posible determinarlo con el examen seminal convencional.

Por lo que se refiere a la recuperación de células espermáticas después del proceso de congelación, en el grupo

de parámetros seminales normales la recuperación fue de 43%, cercano aunque menor al del grupo de parámetros seminales alterados que fue de 59%. Sin embargo, en el grupo de infértil la recuperación es marcadamente reducida, de 15% (Figura 4). Esto significa que en este último grupo, a pesar de que se parte de una cantidad reducida de espermatozoides, el porcentaje de recuperación es muy bajo, lo que se debe considerar al momento de decidir la cantidad de muestras seminales que deben criopreservarse. Por otro lado, se debe destacar que la recuperación más alta se presentó en el grupo de hombres con parámetros seminales alterados a pesar de que el total de células móviles antes de la congelación fue parecido al de los hombres infértil. Esto reafirma la probable existencia de características espermáticas que permiten la supervivencia al proceso de congelación y descongelación y que no son valoradas en el análisis seminal.

También es importante recalcar el gran porcentaje de pérdida espermática debida a la criopreservación en los hombres con infertilidad, lo que debe ser tomado en cuenta al decidir el número de muestras seminales que deben mantenerse en congelación. De hecho, en pacientes con parámetros seminales sumamente alterados, sería conveniente someter una muestra al proceso de criopreservación por un tiempo corto para cuantificar la pérdida y confirmar la existencia de espermatozoides viables después del proceso, porque pudiera darse el caso de que al descongelar la muestra seminal, no hubiera espermatozoides disponibles, generando pérdidas económicas y emocionales en los pacientes si esto ocurre años después, al intentar la aplicación de alguna técnica reproductiva.

## CONCLUSIONES

La criopreservación espermática es una técnica que ha permitido la conservación durante un tiempo indefinido de células hasta el momento en que van a ser utilizadas en los procedimientos de reproducción asistida. A pesar de que este procedimiento amplió las alternativas de tratamiento de la infertilidad, aún hay una pérdida importante debida al daño celular que ocasiona la congelación.

En este estudio se observó disminución de la movilidad y del total de células móviles tanto en las muestras de hombres fértiles como de los infértil, pero la reducción fue mayor en estos últimos. Esto significa que hay mejor recuperación en las muestras de los hombres fértiles que en

las de los infértilos, quizá por características celulares que les permiten tolerar el cambio térmico del procedimiento.

En el grupo de hombres fértiles, pero con alteraciones seminales, y cuyo valor total de células móviles es comparable con el de los pacientes infértilos, la recuperación espermática fue mayor, aunque sin significación estadística, a la de los hombres fértiles con parámetros seminales normales, lo que sugiere la existencia de características celulares que les permiten mayor resistencia al proceso de criopreservación que la que tienen los hombres infértilos.

La recuperación de las muestras seminales congeladas es, aproximadamente, de 50% en los hombres fértiles, pero de sólo 15% en las de los hombres infértilos. Es conveniente hacer una prueba de criopreservación en las muestras seminales con parámetros alterados para saber si hay posibilidades de recuperación al descongelarlas. También es importante tomar en cuenta la pérdida espermática para decidir el número de muestras seminales a congelar considerando su posterior utilización en alguna de las técnicas reproductivas disponibles en la actualidad.

## REFERENCIAS

1. Trottmann M, Becker AJ, Stadler T. Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. *Eur Urol* 2007;52:355-367.
2. Tash J, Gilbert B, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol* 2003;170:1079-1084.
3. Bunge R, Keetel W, Sherman J. Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertil Steril* 1954 Nov-Dec;5(6):520-529.
4. Perloff WH, Steinberger E, Sherman JK. Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor technic. *Fertility and Sterility* 1964;15:501.
5. Mazur P., Freezing of living cells: mechanisms and implications, *Am J Physiol.* 1984 Sep;247(3 Pt 1):C125-142.
6. Agca Y, Critser J. Cryopreservation of Spermatozoa in Assisted Reproduction. *Sem Reprod Med* 2002;20(1):15-23
7. Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol.* 2003 Oct;170(4 Pt 1):1079-1084.
8. Khorram, O., Patrizio, P., Wang, C., Swerdloff, R.: Reproductive technologies for male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2373.
9. Shufaro Y, Schenker JG. Cryopreservation of human genetic material. *Ann N Y Acad Sci* 2010 Sep;1205:220-224.
10. Keller LM, Schuster TG, Ohl DA., Smith GD. Ultra-rapid freezing of severe oligospermic samples using cryoloops. *Fertil Steril suppl* 2002;76:S129.
11. Lucena E, Obando H. Comparative analysis of different glycerol levels when used as cryoprotective agents on human spermatozoa. In: Paulson ID, ed. *Andrology: Male fertility and sterility.* New York, NY: Academic press; 1986:553-555.
12. Hammadeh ME, Greiner S, Rosenbaum P, Schmidt W. Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure. *J Androl.* 2001 Nov-Dec;22(6):1012-1018.
13. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 2008;24:403-411.
14. Paras J, Freisinger L, Esterbauer B, Schmeller N, Szlauer R, Jungwirth A. Cryopreservation technique: comparison of Test yolk buffer versus SpermCryo and vapour versus computerised freezing. *Andrologia* 2008;40(1):18-22.
15. Punyatanasakchai P, Sophonsritsuk A, Weerakiet S, Wansumrit S, Chompurat D. Comparison of cryopreserved human sperm in vapor and liquid phases of liquid nitrogen: effect on motility parameters, morphology and sperm function. *Fertil Steril.* 2008(90)(5); 1978-1981.