



Evaluación de los parámetros seminales en muestras criopreservadas por más de 10 años¹

Kably-Ambe A, Carballo-Mondragón E, Roque-Sánchez AM, Durán-Monterosas L, Amaro-Hernández EA

Resumen

ANTECEDENTES: las muestras espermáticas en criopreservación son susceptibles de daño que se refleja en alteraciones en la movilidad, integridad de la membrana, acrosomales en el ADN.

OBJETIVO: evaluar el índice de fragmentación del ADN, la recuperación de la movilidad y la viabilidad espermática de muestras seminales capacitadas en criopreservación por más de 10 años.

MATERIAL Y MÉTODO: estudio longitudinal, prospectivo y observacional efectuado en muestras seminales criopreservadas a largo plazo (más de 10 años) en un centro mexicano de fertilidad. Las muestras se dividieron según el diagnóstico: con cirugía, fertilización in vitro, oligo-asteno-teratozoospermia y quimioterapia. Se compararon las variables: recuperación en movilidad, índice de fragmentación del ADN y viabilidad espermática. Las variables continuas se designaron como media \pm DE y las categóricas como frecuencias y porcentajes. Se utilizó el programa JMP-V9.

RESULTADOS: se estudiaron 19 muestras seminales criopreservadas a largo plazo y no se encontraron diferencias por tiempo de almacenamiento o volumen inicial. La concentración, movilidad total, número de células móviles y morfología del grupo con oligo-asteno-teratozoospermia fueron diferentes al resto. Hubo diferencia en la morfología inicial del flagelo, los grupos más alterados fueron los de cirugía y fertilización in vitro. En los grupos de cirugía, fertilización in vitro y oligo-asteno-teratozoospermia se logró la recuperación de la movilidad en 27.34, 30.02 y 55.24%, respectivamente. El grupo de quimioterapia no experimentó cambio. En el análisis de viabilidad solo el grupo de oligo-asteno-teratozoospermia tuvo menos de 50% de espermatozoides íntegros. En cuanto a fragmentación de ADN los grupos de cirugía y fertilización in vitro tuvieron menor índice (3.5 ± 2.5 y 3.5 ± 3.01 , respectivamente) en comparación con los grupos de oligo-asteno-teratozoospermia y quimioterapia ($9.8 \pm .2$ y 12.17 ± 3.9).

CONCLUSIÓN: es posible almacenar a largo plazo muestras seminales y recuperar espermatozoides útiles para su uso en reproducción asistida.

PALABRAS CLAVE: infertilidad masculina, criopreservación, movilidad espermática, fragmentación de ADN.

Hospital Ángeles Lomas, Centro Especializado para la Atención de la Mujer (CEPAM), Huixquilucan de Degollado, Estado de México.

¹ Primer lugar del concurso de trabajos de investigación para médicos federados Juan Rodríguez Argüelles (Trabajos de investigación clínica presentados en formato escrito) 66 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia. Acapulco, Gro. 1 al 5 de noviembre de 2015.

Recibido: octubre 2015

Aceptado: diciembre 2015

Correspondencia

Dr. Alberto Kably Ambe
drkably@gmail.com

Este artículo debe citarse como

Kably-Ambe A, Carballo-Mondragón E, Roque-Sánchez AM, Durán-Monterosas L, Amaro-Hernández EA. Evaluación de los parámetros seminales en muestras criopreservadas por más de 10 años. Ginecol Obstet Mex. 2016 ene;84(1):1-6.

Ginecol Obstet Mex. 2016 Jan;84(1):1-6.

Evaluation of semen parameters in long term cryopreserved samples for over 10 years

Kably-Ambe A, Carballo-Mondragón E, Roque-Sánchez AM, Durán-Monterosas L, Amaro-Hernández EA

Abstract

BACKGROUND: Sperm samples subjected to cryopreservation are vulnerable, reflecting changes in membrane integrity, mobility and DNA.

OBJECTIVE: To assess the rate of DNA fragmentation, sperm mobility and recovery viability in capacitated semen samples after cryopreservation for over 10 years.

MATERIAL AND METHOD: Longitudinal, prospective, observational study of 19 seminal samples cryopreserved for more than 10 years, in a mexican fertility center. The sample was divided into 4 groups: Group CX (Surgery), Group IVF (in vitro fertilization), OAT Group (Oligoastheno-teratozoospermia) and QX Group (Chemotherapy), in order to compare variables such as: recovery in mobility, DNA fragmentation index and sperm viability. Continuous variables were designated as means \pm SD, and categorical variables as frequencies and percentages. JMP-V9 program was used.

RESULTS: There is no difference in storage time and initial volume. The concentration, total mobility, total motile cells and morphology in OAT group are different from the rest. There is difference in initial morphology of the tail, showing more altered parameters in CX and IVF groups. In the CX, FIV and OAT Groups was achieving a mobility recovery of 27.34%, 30.02% and 55.24% respectively. The QX group presented no change. By analyzing the viability only OAT group presented <50% intact sperm. For DNA fragmentation CX Groups and IVF showed the lowest rate (3.5 ± 2.5 and 3.5 ± 3.01 respectively) compared with OAT Groups and QX (9.8 ± 0.2 and $12, 17 \pm 3.9$).

CONCLUSION: It is possible to store semen samples for a long period of time, retrieving suitable viability sperm useful for assisted reproduction techniques.

KEYWORDS: Infertility; male; cryopreservation; sperm motility; DNA fragmentation

Hospital Ángeles Lomas, Centro Especializado para la Atención de la Mujer (CEPAM), Huixquilucan de Degollado, Estado de México.

Correspondence

Dr. Alberto Kably Ambe
drkably@gmail.com

ANTECEDENTES

Los avances en las técnicas de reproducción asistida han permitido el desarrollo de nuevos

métodos de manipulación celular, como la criopreservación espermática, decisiva y potencialmente benéfica, sobre todo para tratar la infertilidad por factor masculino.¹⁻⁴ Algunas de



sus indicaciones rutinarias son en individuos con: azoospermia obstructiva, oligozoospermia, radio-quimioterapia y donación. Si bien se considera una herramienta útil, es importante analizar que la técnica *per se* puede causar cierto grado de daño celular.

Existen ciertos parámetros que deben evaluarse en las muestras descongeladas, porque sus valores pueden predecir un adecuado potencial fértil, como: movilidad, integridad de la membrana, acrosoma y del ADN, que son reflejo de afectación en distintos sitios: mitocondria, membrana celular, acrosoma y flagelo.^{5,6}

La disminución en la movilidad espermática es el principal marcador de daño posterior a la criopreservación, que puede explicarse como resultado de daño osmótico directo, choque térmico y, sobre todo, hacia un daño mitocondrial que afectaría su función. En la bibliografía se ha reportado una disminución en la recuperación de la movilidad con valores entre 24 y 64%, mientras que otros autores mencionan incluso 84%.⁷

La integridad de la membrana celular debe demostrarse mediante estudios ultraestructurales como la microscopia electrónica o fisiológicos como la prueba hipoosmótica. Se ha observado que las membranas se desestabilizan y muestran cambios en las concentraciones moleculares, en la interacción lípido-proteína que altera la permeabilidad. La prueba hipoosmótica puede indicar, además de integridad o no de la membrana celular, criorresistencia, que se valora midiendo la capacidad de enrollamiento espontáneo del flagelo, que alcanza valores, en estudios previos, significativos comparados con la técnica de tinción vital. Diversos autores han encontrado mayor daño a la membrana de 20 a 70%.^{8,9}

Otro parámetro que se ve afectado es la morfología, que depende de la calidad espermática previa a la criopreservación.

Existen alteraciones espermáticas que no son susceptibles de análisis mediante técnicas tradicionales, como el estudio de la estabilidad de la cromatina; sus anormalidades se han asociado con falla en las técnicas de reproducción asistida debido a que puede modificarse con la criopreservación y causar alteraciones en la integridad del ADN y, por lo tanto, en el desarrollo embrionario.¹⁰

Es importante considerar a los pacientes con padecimientos oncológicos, en donde el porcentaje de fragmentación del ADN es mayor. En estos pacientes se recomienda criopreservar muestras seminales previo a los tratamientos necesarios para la enfermedad de base.

A la fecha son pocos los estudios que documentan el daño que podrían sufrir las muestras seminales debido al tiempo de almacenamiento; en las guías de donación no se ha estandarizado un límite de tiempo, razón por la que se decidió efectuar este estudio con el propósito de evaluar la fragmentación del ADN, recuperación de la movilidad y viabilidad espermática de muestras seminales capacitadas que permanecieron en criopreservación por más de 10 años.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio longitudinal, prospectivo y observacional efectuado con muestras seminales criopreservadas en un centro mexicano de fertilidad; se incluyeron las que tenían 10 a 18 años de almacenamiento que serían inactivadas por consentimiento de los pacientes.

El análisis de las muestras se dividió en cuatro grupos: 1) Con cirugía; muestras seminales de varones que deseaban criopreservación antes de una intervención quirúrgica que pudiera afectar su fertilidad. 2) Fertilización *in vitro*; muestras de varones aptos para fertilización *in vitro*, con parámetros seminales normales que no podrían

estar el día de la captura folicular. 3) Con oligo-asteno-teratozoospermia; muestras seminales de individuos con esta afección aptos para alguna técnica de reproducción asistida. 4) De pacientes con quimioterapia o radioterapia por cáncer.

La criopreservación se efectuó con una dilución 1:1 de semen y medio TYB (Irvine, Sci); la muestra se homogeneizó y colocó a 4°C durante 30 minutos, enseguida se colocó en vapores de nitrógeno por espacio de 35 minutos y se sumergió en nitrógeno líquido para su almacenamiento. Para su descongelación la muestra se colocó 5 minutos en baño maría a 37°C y se procedió de acuerdo con el protocolo. Se midieron los parámetros de movilidad, densidad y morfología inicial. Después de evaluarlas se procedió a la capacitación espermática por gradientes (Isolate®) y se analizaron las variables de: movilidad espermática, prueba hipoosmótica y fragmentación del ADN mediante prueba de HALO.

Las variables continuas se designaron como medias y desviaciones estándar, y para determinar la significación estadística se realizó regresión logística univariada. Las variables categóricas se evaluaron en frecuencias y porcentajes. Los cálculos se realizaron con el programa de cómputo JMP versión 9.

RESULTADOS

Se analizaron 19 muestras; los datos demográficos se señalan en el Cuadro 1. No hubo diferencia significativa en el tiempo de almacenamiento ni en el volumen inicial. Como era de esperarse, los parámetros de concentración, movilidad total, total de células móviles y morfología del grupo con oligo-asteno-teratozoospermia fueron diferentes al resto de los grupos. Se observó una diferencia en la morfología del flagelo en los grupos con cirugía, fertilización in vitro,

oligo-asteno-teratozoospermia y quimioterapia de: 28, 24, 19 y 17%, respectivamente. La edad del grupo de individuos que recibieron quimioterapia fue menor en comparación con la de los grupos con cirugía, fertilización in vitro y oligo-asteno-teratozoospermia.

Luego de la descongelación se observó disminución en la movilidad espermática en los grupos: con cirugía, fertilización in vitro y oligo-asteno-teratozoospermia; el porcentaje de recuperación fue de: 27.34, 30.02 y 55.24%, respectivamente. El grupo con quimioterapia no mostró cambios en la movilidad. (Figura 1)

Las muestras de los grupos inicialmente clasificados como normales (con cirugía y fertilización in vitro) tuvieron la menor tasa de recuperación de la movilidad. (Figura 1)

Al analizar los resultados de la prueba hipoosmótica, solo el grupo de oligo-asteno-teratozoospermia tuvo menos de 50% de espermatozoides con membranas íntegras. (Figura 2)

Por lo que se refiere a la fragmentación de ADN en los grupos con cirugía y fertilización in vitro hubo menor índice (3.5 ± 2.5 y 3.5 ± 3.01 , respectivamente) que en los grupos de oligo-asteno-teratozoospermia y con quimioterapia ($9.8 \pm .2$ y 12.17 ± 3.9). (Figura 3)

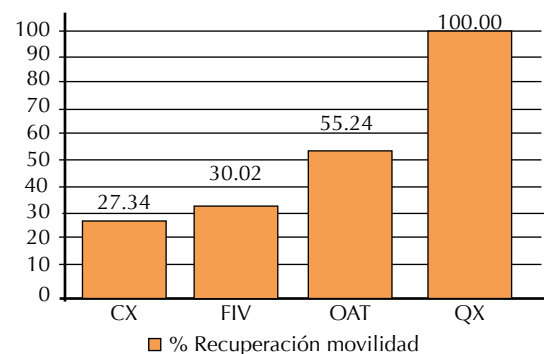
DISCUSIÓN

Este estudio se efectuó para evaluar los efectos a largo plazo de la criopreservación espermática en los parámetros de movilidad, integridad de membrana y fragmentación del ADN analizados con base en el diagnóstico con el que se almacenaron.

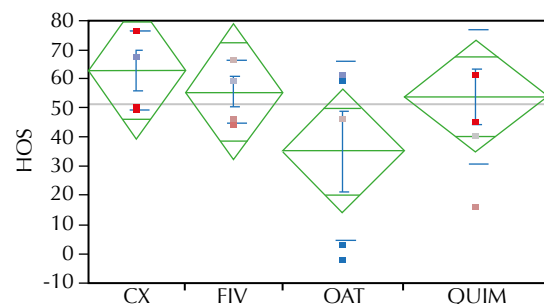
La criopreservación tuvo un efecto negativo en los parámetros de movilidad, resultado semejante a lo reportado en la bibliografía. Durante


Cuadro 1. Datos demográficos de los pacientes antes de la criopreservación

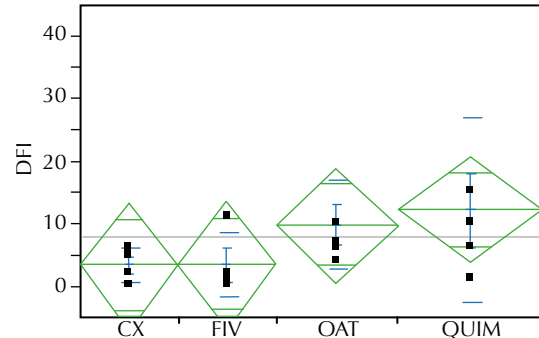
	Con cirugía	Fertilización <i>in vitro</i>	Oligo-asteno-teratozoospermia	Quimioterapia
n	4.00	4.00	5.00	6.00
Edad (años)	35.75 ± 6.02	35 ± 4.69	36.4 ± 10.16	18.33 ± 10.16
Tiempo de almacenamiento (años)	15.50	13.50	14.00	18.10
Volumen total (mL)	3.95	3.08	2.76	1.58
Concentración espermática	514.80	336.35	21.80	104.42
Movilidad total (%)	59.50	51.00	17.80	54.50
Total células móviles (TCM) (millones)	69.13	60.03	2.48	20.47



CX: cirugía; FIV: fertilización *in vitro*; OAT: oligo-asteno-teratozoospermia; QX: quimioterapia

Figura 1. Porcentaje de recuperación de la movilidad post-descongelación.

Figura 2. Resultados de la prueba HOS por grupos.

la maduración, el espermatozoide pierde gran parte del citoplasma y sus mecanismos de re-


Figura 3. Índice de fragmentación del ADN por grupos.

paración y defensas enzimáticas disminuyen en comparación con otras células, circunstancia que puede dañar la cromatina debido a la criopreservación. En este estudio se encontró que el efecto en la movilidad fue mayor en las muestras catalogadas normales antes de almacenarlas (grupos criopreservación y fertilización *in vitro*). Sin embargo, en el grupo de quimioterapia se observó mejor recuperación en la movilidad, quizá debido al efecto de la edad porque eran muestras de varones más jóvenes, lo que coincide con las observaciones de la bibliografía.¹¹ Otra posible explicación es que inicialmente en los grupos cirugía y fertilización *in vitro* se encontró mayor alteración en la morfología del flagelo en comparación con el grupo cirugía y oligo-asteno-teratozoospermia.

También está descrito que el proceso de congelación-descongelación puede incrementar la lipoperoxidación de la membrana, afectar la movilidad y condensación de la cromatina. Como era de esperarse, el porcentaje de espermatozoides con menor valor en la prueba hipoosmótica se encontró en el grupo que inicialmente estaba más alterado (oligo-asteno-teratozoospermia: 35.4%), en el resto de los grupos el índice se encontró por arriba de 50%, un valor superior a 40% es un buen predictor de integridad de la membrana.

Las muestras seminales de pacientes con cáncer testicular, linfoma y leucemia tuvieron deterioro en la integridad del ADN, que se incrementó después de los tratamientos de quimio-radioterapia. En este estudio se encontró este efecto, los pacientes del grupo con quimioterapia tuvieron mayor grado de fragmentación del ADN, aun así los resultados no alcanzan 15%, límite mencionado como punto de corte para que la fertilidad se vea afectada.^{12,13}

Existen estudios a corto plazo de almacenamiento durante 3 meses de muestras en vapores de nitrógeno que no reportan afectación de los parámetros generales de movilidad, morfología e índice de fragmentación del ADN. En nuestra búsqueda este es el primer estudio que compara el efecto a largo plazo de la criopreservación espermática en la fragmentación del ADN; sin embargo, hacen falta más estudios para definir la relación causal entre criopreservación a largo plazo y calidad espermática.

CONCLUSIÓN

Las muestras seminales pueden almacenarse a largo plazo y recuperar los espermatozoides con viabilidad adecuada para su uso en técnicas de reproducción asistida.

REFERENCIAS

1. Conell MO, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Rep* 2002; 17(3): 764-709.
2. de Paula TS, Pimenta BR, Montagnini SD, Cunha MA, Schor N, Pereira CA. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertil Steril*, 2006; 86:597-600.
3. Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril*, 2001;76:892-900.
4. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*, 2008; 25:403-411.
5. Giraud MN, Motta C, Boucher D, Grizard G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum reprod*, 2000; 15(10): 2160-2164.
6. Yogev L, Kleiman SE, Shabtai E, Botchan A, Paz G, Hauser R, Lehavi O, Yavetz H, Gamzu R. Long-term cryostorage of sperm in a human sperm bank does not damage progressive motility concentration. *Hum Reprod*, 201; 25(5):1097-1103.
7. Royere D, Barthelemy C, Hamamah S, Lansac J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Hum Reprod Update*, 1996; 2(6):553-559.
8. Hammadeh ME, Szarvasy D, Zeginiadou T, Rosembaum P, Georg T, Schmidt W. Evaluation of Cryoinjury of Spermatozoa After Slow (Programmed Biological Freezer) or Rapid (Liquid Nitrogen Vapour) Freeze-Thawing Techniques. *J Assist Reprod Genet*, 2001;18(7).
9. Hossain A, Osuamkpe C, Hossain S, Phelps JY. Spontaneously developed tail swellings (SDTS) influence the accuracy of the hypo-osmotic swelling test (HOS-test) in determining membrane integrity and viability of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*, 2010; 27:83-86.
10. Zribi N, Feki CN, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar KL. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril*, 2010;93:159-66.
11. Clarke GN, Liu DY, Gordon BHW. Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertil Steril*, 2006; 86:721-2.
12. Edelstein A, Yavetz H, Kleiman SE, Botchan A, Hauser R, Paz G, Yogev L. Deoxyribonucleic acid-damaged sperm in cryopreserved-thawed specimens from cancer patients and healthy men. *Fertil Steril*, 2008; 90:205-8.
13. Jackson RE, Bormann CL, Hassun PA, Rocha AM, Motta EMA, Serafini PC, Smith GD. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril*, 2010;94:2626-30.