Biologia de la reproducció
Vol. 17, p. 51-55 (2022)

COMPARACIÓ DE TRES MEDIS COMERCIALS DE CRIOPRESERVACIÓ PER LA CRIOPRESERVACIÓ D'ESPERMATOZOIDES HUMANS

Iris Bernal*, Tatiana Torrecillas, Magalí Cufré, Nerea Colls, Mark Grossman i Camps, Anna Rabanal
Barcelona IVF; carrer de les Escoles Pies 103, Barcelona.

*Autor corresponent: iris.bernal@bcnivf.com

Resum

La criopreservació de semen és una tècnica emprada de forma rutinària en la tecnologia de reproducció assistida (TRAs) que permet preservar la fertilitat masculina. Malgrat la seva utilitat, el procediment de la criopreservació té efectes deleteris que solen implicar una disminució de la motilitat i de la vitalitat espermàtica. Actualment existeix una àmplia varietat de medis comercials de criopreservació que contenen diferents crioprotectors per tal de minimitzar aquest dany espermàtic, però no està establert quin pot ser més eficaç. En aquest treball s'ha realitzat un estudi retrospectiu i comparatiu per tal d'avaluar la motilitat espermàtica post-descongelació utilitzant tres medis comercials de criopreservació diferents: SpermFreeze™ (Vitrolife), CryoSperm™ (Origio) i Tris Yolk Buffer (TYB, IrvineScientific), mitjançant el mètode de criopreservació lenta. Els resultats no mostren diferències significatives en el percentatge de supervivència d'espermatozoides mòbils progressius entre els tres medis de criopreservació. A més, també s'observa variabilitat en el percentatge de supervivència indiferentment del crioprotector utilitzat, possiblement degut a les característiques intrínseques de les mostres. Per tant, a les nostres mans, no podem confirmar que disposem d'un crioprotector més eficaç en quant a la recuperació d'espermatozoides mòbils progressius post-descongelació.

Abstract

Semen cryopreservation is a routine technique used in assisted reproductive technology (ART) that leads preserve masculine fertility. Although its utility, the cryopreservation procedure has a deleterious effect that generally involves the reduction of sperm motility and vitality. Actually, it exists a great variety of commercially cryopreservation media which contains cryoprotectants for try to reduce this sperm damage, but it is not well established which is the most effective. This work, is a retrospective and comparative study to evalue the efficency of sperm motility post-thaw recovery using three different commercially cryopreservation media: SpermFreeze (Vitrolife), CryoSperm (Origio) and Tris Yolk Buffer (IrvineScientific), through slow cryopreservation method. Results do not show any remarkable difference in the percentage of survival of progressive mobiles sperm between the three media of cryopreservation. Besides, it is also shown very high variability on the percentage of survival, possibly due to the features of the samples. Therefore, we cannot confirm that we get a more efficient criprotector as for the recovery of mobile and progressive post-thaw sperm.

INTRODUCCIÓ

La criopreservació del semen, realitzada en humans amb èxit per primer cop en 1964 (Sherman,1973), és una tècnica que permet preservar el espermatozoides emmagatzemats a baixa temperatura (-196°C) de forma indefinida. La seva aplicació pot ser útil en casos on es necessita preservar la fertilitat masculina per tal de tenir més opcions d'èxit reproductiu (p.e. tractaments gonadotòxics com la quimioteràpia), en casos on l'ús de semen criopreservat és l'única opció (p.e. la inseminació de donant) o també en situacions més rutinàries en les que l'home crioconserva una mostra de semen per si no pot ser present el dia de la punció fol·licular.

Durant el procediment de la criopreservació, els espermatozoides estan exposats a una sèrie de fenòmens físics i químics entre els quals trobem la deshidratació cel·lular, la formació de cristalls

intracel·lulars, l'estrès osmòtic i el xoc tèrmic (Sharafi, M. *et al.,* 2018). Tots aquests esdeveniments comporten canvis adversos en la composició lipídica de la membrana, en la motilitat espermàtica i en l'estructura de l'acrosoma, fets que podrien comprometre la capacitat fecundant dels espermatozoides (Verheyen G *et al.*,1993).

Actualment existeixen medis comercials de criopreservació que en la seva composició inclouen components crioprotectors com el glicerol i altres additius com rovell d'ou per tal d'intentar minimitzar aquest efecte negatiu que té el procés de congelació-descongelació en els espermatozoides. Malgrat la gran varietat de medis crioprotectors disponibles al mercat, a les nostres mans, no coneixem si n'hi ha algun que sigui més eficaç.

L'objectiu d'aquest estudi és establir si existeixen diferències en l'eficàcia de recuperació d'espermatozoides mòbils progressius post-descongelació entre tres medis comercials de criopreservació diferent: SpermFreeze™ (Vitrolife), CryoSperm™ (Origio) i Tris Yolk Buffer (TYB, IrvineScientific).

MATERIAL I MÈTODES

Es va realitzar un estudi retrospectiu i comparatiu que va incloure un total de 185 pacients, d'entre 24 a 50 anys, que van acudir al centre de reproducció assistida Barcelona IVF durant el període del 2021 per criopreservar mostra seminal. Les mostres van ser obtingudes, per masturbació, en un pot d'obtenció estèril després d'un període de 2-7 dies d'abstinència sexual, amb el previ consentiment informat, van ésser avaluades i criopreservades.

Anàlisi seminal. L'avaluació dels paràmetres seminals de les mostres es va realitzar seguint les recomanacions descrites en el Manual de l'Organització Mundial de la Salut (World Health Organization, 2010). Un cop les mostres es van liquar, es va valorar el volum mitjançant una pipeta automàtica mentre que la concentració i motilitat espermàtica es va obtenir fent ús de la càmera de Makler®. Es va dur a terme l'extensió espermàtica a un portaobjectes per tal de fer posteriorment la valoració morfològica mitjançant la tinció *Diff Quick©*. Per la realització de l'estudi, només es van incloure les mostres de pacients que van presentar uns valors de normalitat respecte al volum, concentració, motilitat espermàtica i morfologia (World Health Organization, 2010).

Protocol de criopreservació seminal. Per la criopreservació del semen es va utilitzar com a medi de criopreservació SpermFreeze™ (Vitrolife), CryoSperm™ (Origio) i Tris Yolk Buffer (TYB, IrvineScientific), de forma aleatòria, en funció de la disponibilitat d'estoc al centre en el moment de realitzar la tècnica. El mètode de criopreservació amb cadascun dels tres medis va ser el de corba lenta tal i com indicaven les instruccions de cada fabricant.

Per l'ús de qualsevol dels tres medis de criopreservació es va diluir la mostra de semen amb el crioprotector, gota a gota, fins obtenir una relació 1:1. Transcorregut 10 minuts a temperatura ambient per deixar actuar el crioprotector, el semen diluït es va col·locar en palletes (CBS High security sperm straw) que van ser segellades per iniciar el procés de congelació. Les mostres criopreservades amb SpermFreeze Solution™ i CryoSperm™ es van portar a vapors de nitrogen a -96ºC durant 30 minuts i després es van submergir en nitrogen líquid a -196ºC fins el moment de la descongelació. En el cas del Tris Yolk Buffer, la mostra va passar per un pas previ de 90 minuts en nevera de 2 a 5 ºC abans de portar-les a vapors de nitrogen (-96ºC) i nitrogen líquid (-196ºC).

Per la descongelació, les palletes es van mantenir a temperatura ambient durant 7 minuts indistintament del medi de criopreservació utilitzat. Finalment, es va avaluar la concentració d'espermatozoides mòbils progressius post-descongelació (World Health Organization, 2010).

Anàlisi de les dades. Els paràmetres que es van analitzar per realitzar l'estudi van ser la concentració d'espermatozoides mòbils progressius en la mostra en fresc i el percentatge de supervivència

d'espermatozoides mòbils progressius obtinguda a partir de la concentració d'espermatozoides mòbils progressius post-descongelació. Per tal de comparar si existien diferències significatives entre els tres medis de criopreservació es va realitzar el test ANOVA mitjançant el software estadístic R versió 3.6.3 (R Core Team, 2020) establint com a significatiu un p-valor <0.05.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Un total de 185 pacients van criopreservar mostra seminal. Es va criopreservar les mostres seminals de 66 pacients amb CryoSperm™, 69 mostres seminals de pacients amb SpermFreeze Solution™ i 50 mostres seminals de pacients amb Test Yolk Buffer. (Taula 1).

La mitjana de concentració d'espermatozoides mòbils progressius en fresc va ser de 30,8 M/ml amb uns valors de màxim i mínim de 220 M/ml i 2,6 M/ml, respectivament. La mitjana del percentatge de supervivència d'espermatozoides mòbils progressius general va ser de 20,9% amb uns valors de màxim i mínim de 70,9% i 0,4%, respectivament. La mitjana d'edat dels pacients que es van incloure en l'estudi va ser de 42 anys, amb uns valors de màxim i mínim de 24 i 50 anys respectivament (Taula 1).

```
> summary(datos_criopl)
             crioprotector      edat        concentracio.mp.fresc supervivencia
 cryosperm           :66    Min.   :24.00   Min.   :  2.60        Min.   : 0.38
 spermfreeze solution:69    1st Qu.:39.00   1st Qu.: 13.80        1st Qu.:11.36
 test yolk buffer    :50    Median :42.00   Median : 30.80        Median :20.93
                            Mean   :41.58   Mean   : 37.25        Mean   :23.00
                            3rd Qu.:45.00   3rd Qu.: 49.40        3rd Qu.:30.77
                            Max.   :50.00   Max.   :220.00        Max.   :70.87
```

Taula 1. Sumari de mostres de pacients criopreservades amb Cryosperm™, SpermFreeze™ i Test Yolk Buffer, i mitjana, mediana, primer i tercer quartil i màxim i mínim dels paràmetres analitzats: edat, concentració de mòbils progressius en fresc i supervivència de mòbils progressius post-descongelació.

El test ANOVA no va mostrar diferències significatives en el percentatge de supervivència d'espermatozoides mòbils progressius en funció del medi de criopreservació utilitzat ($P > 0{,}05$). Per tant, aquest resultat ens indica que, a les nostres mans, no disposem d'un medi de criopreservació que sigui més eficaç.

Alguns estudis han mostrat que l'ús de TYB rendeix a una millor recuperació de la motilitat espermàtica post-descongelació (Jeyendran RS et al., 1995; Stanic et al.,2000) pel fet que, possiblement, les lipoproteïnes, fosfolípids i colesterol que conté el rovell d'ou podrien ajudar a mantenir l'estabilitat i fluïdesa de la membrana dels espermatozoides durant el procés de criopreservació (Gamzu R et al., 1997). Aquest fet ens va fer pensar que l'ús de TYB mostraria una major eficàcia en la recuperació d'espermatozoides mòbils progressius, fet que no s'ha demostrat en aquest estudi. Això podem associar-ho a què, excepte la presència del rovell d'ou, tots tres medis de criopreservació són força similars pel que fa a la seva composició i tots tres porten glicerol com a crioprotector principal.

Una altra raonament perquè no s'hagi obtingut diferències significatives podria ser el fet que tots tres medis fan ús del mateix mètode convencional de criopreservació lenta en el qual es va produint una baixada gradual de la temperatura fins a arribar a -196ºC . El TYB passa per un pas previ de descens de temperatura a 2-5 °C durant 90 minuts, fet que ens va fer pensar que ens milloraria les taxes de recuperació d'espermatozoides mòbils post-descongelació, però els resultats no mostren una major eficàcia respecte

als altres medis de criopreservació de l'estudi. A més, com el CryoSperm i el SpermFreeze Solution passen directament a una temperatura de -96 °C, pel que fa a durada del protocol podríem dir que aquests dos són més eficients pel que fa a la relació del temps de durada del procés de criopreservació.

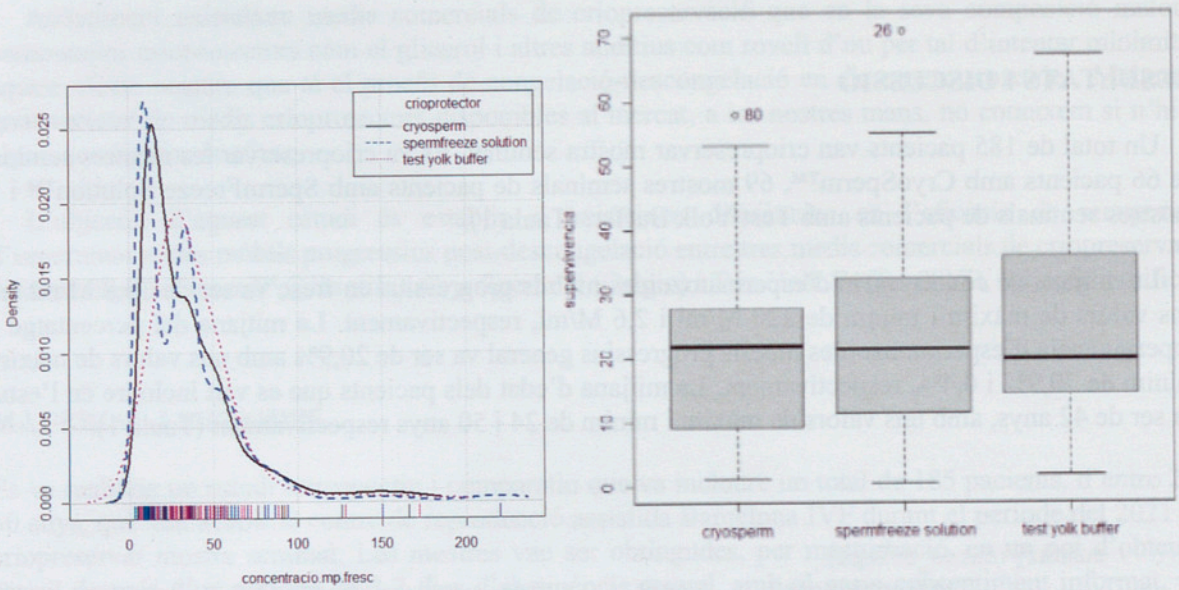

Figura 1. Gràfic de densitat de la concentració d'espermatozoides mòbils progressius de les mostres criopreservades amb Cryosperm™, SpermFreeze™ i Test Yolk Buffer (esquerra). Diagrama de caixes on es mostra el la distribució del percentatge de supervivència d'espermatozoides mòbils progressius amb Cryosperm™, SpermFreeze™ i Test Yolk Buffer (dreta).

La distribució de la concentració d'espermatozoides mòbils progressius va mostrar que, dins de la normozoospermia diagnosticada en totes les mostres, aquelles que presentaven una major concentració d'espermatozoides mòbils progressius van ser criopreservades majoritàriament amb TYB i, en menor grau amb SpermFreeze Solution™, mentre que les mostres criopreservades amb CryoSperm presentaven una menor concentració d'espermatozoides mòbils progressius (Figura 1). Aquest fet no es pot atribuir a cap aspecte del estudi, ja que les mostres van ser criopreservades amb el medi de criopreservació que disposàvem disponible el dia que es va obtenir cada mostra de semen.

El diagrama de caixes mostra la distribució del percentatge de supervivència d'espermatozoides mòbils progressius per cadascun dels medis de criopreservació analitzats (Figura 1). En aquest podem observar una gran variabilitat en el percentatge de supervivència d'espermatozoides mòbils progressius pel que fa a cadascun dels medis de criopreservació utilitzats. Estudis han mostrat que l'habilitat dels espermatozoides per sobreviure als processos de congelació-descongelació varia entre els homes en funció de les característiques intrínseques dels mateixos espermatozoides com pot ser la composició de la membrana i la seva fluïdesa (Giraud *et al.,* 2000). En aquest estudi, s'ha de tenir en compte que s'ha fet una comparació entre mostres de pacients diferents i, per tant, aquesta variabilitat es podria associar a la variabilitat que també veiem en la concentració de mòbils progressius de les diferents mostres. A més, com aquesta gran variabilitat s'observa indiferentment del crioprotector emprat, podem atribuir-la a la mateixa variabilitat associada a les característiques intrínseques de cadascuna de les mostres seminals. En estudis futurs podria ser interessant plantejar el mateix estudi comparatiu, però criopreservant alíquotes de la mateixa mostra amb els diferents medis de criopreservació, per tal de poder atribuir aquestes variacions únicament a l'ús del crioprotector.

CONCLUSIÓ

Els resultats d'aquest estudi mostren que, a les nostres mans, no podem confirmar que disposem d'un medi de criopreservació més eficaç pel que fa a la recuperació d'espermatozoides mòbils post-descongelació. Per tant, pel moment, podem seguir fent ús indiscriminat dels medis de criopreservació disponibles al centre Barcelona IVF per realitzar la tècnica de criopreservació de mostres seminal.

AGRAÏMENTS

Gràcies a la col·laboració i acompanyament durant la realització d'aquest treball als meus companys i en especial a Mark Grossmann i Anna Rabanal.

BIBLIOGRAFIA

Giraud MN. *et al.*, 2000. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa Human Reproduction 15, 2160–2164.

Jeyendran, RS. *et al.*, 1995. TEST-yolk media and sperm quality. Hum Reprod Update 1,73–9.

Sharafi, M. *et al.*, 2018. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. Reprod Biomed Online 37, 327-339.

Sherman, J. 1973. Synopsis of the Use of Frozen Human Semen Since 1964: State of the Art of Human Semen Banking. Fertility and Sterility 24, 397-412.

Stanic, P. *et al.*, 2000. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 9, 65–70.

Verheyen, G., Pletincx, I., Van Steirtegham, A. 1993. Effect of freezing methods, thawing temperature, and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. Hum Reprod 8,1672–84.