

ANÀLISI DEL PERCENTATGE D'ESPERMATOZOIDES MÒBILS PROGRESSIUS PRE I POST-CRIOPRESERVACIÓ/DESCONGELACIÓ I SUPERVIVÈNCIA ESPERMÀTICA EN PACIENTS NORMOZOOSPÈRMICS

Carla Selva Viñals*, Mark Grossmann i Camps, Anna Rabanal Anglada, Cristina Guix Galcerán, Olga Serra Ortiz, Raúl Olivares Vela, Luis Zamora Corzo

Barcelona IVF. www.barcelonaivf.com

08017 Barcelona. laboratorio@bcnivf.com; mark.grossmann@bcnivf.com; anna.rabanal@bcnivf.com

Resum

La criopreservació de mostra seminal és una pràctica rutinària en els centres de reproducció assistida tot i que encara no s'han aconseguit uns protocols òptims que permetin recuperar una elevada concentració d'espermatozoides mòbils. L'objectiu d'aquest estudi és determinar la motilitat pre-criopreservació i post-descongelació i la supervivència d'espermatozoides mòbils progressius. Es tracta d'un estudi retrospectiu que inclou 143 mostres de pacients normozoospermics que han estat criopreservades mitjançant SpermCryoProtecII™ i emmagatzemades en nitrogen líquid.

Els resultats obtinguts mostren una disminució en la motilitat progressiva (23,9% motilitat A+B post-descongelació respecte d'un 53,4% motilitat A+B pre-criopreservació) i una taxa de supervivència d'espermatozoides mòbils del 44,7% post-descongelació.

Paraules clau: Criopreservació; motilitat espermàtica pre-criopreservació; motilitat espermàtica post-descongelació; supervivència espermàtica.

Abstract

Sperm cryopreservation is a daily routine practice in most assisted reproduction centres although optimal and standardized protocols which preserve sperm motility have not been achieved yet. The main goal of the present study is to determine pre-freeze and post-thaw motility and the survival of progressive motile sperm. This retrospective study involves 143 semen samples of normozoospermic patients frozen with Sperm CryoProtecII™ and stored into liquid nitrogen. The results obtained show a decrease in progressive motility (23,9% post-thaw A+B motility versus 53,4% pre-freeze A+B motility) and a motile sperm survival rate of 44,7% after thawing.

Key words: Cryopreservation; pre-freeze sperm motility; post-thaw sperm motility; sperm survival.

INTRODUCCIÓ

Actualment la criopreservació de mostra seminal és una pràctica comuna en els centres de reproducció assistida i a la pràctica clínica. Els motius per decidir criopreservar una mostra poden anar des de la preservació de la fertilitat en situacions de càncer, quimioteràpia o intervenció quirúrgica, fins a casos on hi ha dificultat en la obtenció de la mostra el dia de la inseminació oocitària.

Les mostres es poden mantenir criopreservades sota les condicions adients llargs períodes de temps sense que les seves característiques, com motilitat i viabilitat, es vegin afectades (Rofeim *et al.*, 2005).

Existeixen diferents protocols de criopreservació-descongelació i diferents solucions que contenen crio-

protectors, però en els darrers anys hi ha hagut pocs avenços pel que fa a la millora de la supervivència espermàtica post-descongelació, de manera que la congelació de mostra seminal encara no es troba en el seu punt òptim (Fabozzi *et al.*, 2016; Omes *et al.*, 2013).

L'objectiu d'aquest estudi és determinar la diferència entre la motilitat d'una mostra abans de criopreservar-la i la mateixa mostra després de descongelar; així com establir els valors de supervivència d'espermatozoides mòbils en mostres normozoospermiques.

MATERIAL I MÈTODES

Estudi retrospectiu de 143 mostres seminals analitzades en fresc i després de criopreservar i descongelar.

Els 143 pacients inclosos en l'estudi eren individus amb mostres normozoospermiques, segons els criteris establerts per la OMS (WHO, 2010), en les que es descartava el factor masculí com a causant de l'esterilitat de la parella.

Les mostres eren analitzades en fresc el dia de la criopreservació abans de procedir a realitzar aquest procés, i després re-analitzades el dia de la descongelació. Les mostres van ser descongelades abans d'1 any i posteriorment varen ser utilitzades per a realitzar ICSI.

Comptatge de la mobilitat espermàtica

El comptatge de la mobilitat espermàtica es va realitzar mitjançant cambra Makler i segons els criteris publicats al manual de la OMS. Per valorar el percentatge de motilitat i totes les anàlisis es varen tenir en compte els espermatozoides mòbils progressius o espermatozoides amb mobilitat tipus A + B.

Les mostres es varen valorar un cop liquades a temperatura ambient (mínim 20 minuts després de l'obtenció).

Criopreservació de les mostres seminals

Les mostres es criopreservaren sense processar utilitzant la solució SpermCryoProtecII™ en dilució 1:3. Primerament es va afegir la solució a la mostra, seguidament es varen carregar les palletes (CBS®) de 0,5mL i es varen deixar en vapors de N₂L durant 20 min. Finalment les palletes es varen submergir en nitrogen líquid i emmagatzemar submergides en un tanc de nitrogen.

Descongelació de les mostres seminals

El dia de la inseminació oocitària, les mostres varen ser descongelades en una superfície calefactada durant 7 min i posteriorment es va valorar la motilitat mitjançant la cambra de comptatge. Finalment es varen processar per la posterior ICSI.

Anàlisi estadística

Les dades es van analitzar estadísticament mitjançant estadística descriptiva i *t-test* de doble cua. Els valors

amb $P < 0,01$ varen ser considerats estadísticament significatius.

RESULTATS

Motilitat en mostres fresques versus mostres congelades

S'analitzen un total de 286 mostres (en realitat 143 mostres en 2 moments diferents). La Taula 1 mostra l'anàlisi de la motilitat en percentatges de la mostra en fresc i l'anàlisi de la motilitat de la mateixa mostra un cop congelada i descongelada. Cada fila de les 4 columnes que es llisten es refereix a la mateixa mostra en diferents moments (pre i post-congelació-descongelació, i supervivència).

La mitjana de la motilitat (espermatozoides A+B) de les mostres fresques analitzades és de 53,4% mentre que la mitjana en les mateixes mostres però criopreservades i després descongelades és de 23,9% (Taula 2). El màxim percentatge d'espermatozoides mòbils en fresc és de 85,7% i el mínim és de 19,6%, mentre que en les mostres congelades/descongelades el màxim correspon a un percentatge del 57,9% i el mínim del 3% (Taula 2).

L'anàlisi estadística de la motilitat en fresc comparada amb la motilitat post-descongelació mitjançant *t-test* mostra que hi ha diferències estadísticament significatives entre ambdues, tal i com s'il·lustra a la Figura 1.

Supervivència d'espermatozoides mòbils

La supervivència d'espermatozoides mòbils s'ha calculat a partir del percentatge d'espermatozoides mòbils recuperats post-congelació-descongelació i del percentatge de mòbils abans de la criopreservació (Taula 1).

La mitjana de supervivència d'espermatozoides mòbils és de 44,7% (Taula 3). El rang de supervivències és força ampli, entre el 5,6% i el 74,9% (Taula 3). La menor supervivència rau en la baixa concentració d'espermatozoides mòbils recuperats en aquesta mostra (3% d'espermatozoides mòbils progressius).

Taula 2. Estadística descriptiva de la motilitat A+B en mostres analitzades en fresc i després de congelar/descongelar.

Tipus Mostra	n	Mitjana Motilitat (±SEM)	Mediana	Mínim	Màxim
Mostra Fresca	143	53,4% (±1,1)	52,9%	19,6%	85,7%
Mostra Congelada/Descongelada	143	23,9% (±0,9)	23,7%	3%	5,5%

143 mostres analitzades pre-congelació/descongelació i post-congelació/descongelació.

Taula 1. Resultats del comptatge d'espermatozoides mòbils A+B en les mostres en fresc i en les mateixes mostres després de criopreservar i descongelar. Es mostren 4 columnes amb 3 subcolumnes cada una, cada fila de les 3 subcolumnes representa la mateixa mostra abans (A+B Fresc), després de congelar-descongelar (A+B Crio.) i la supervivència d'espermatozoides mòbils de la mostra després de congelar-descongelar.

A+B Fresc	A+B Crio,	Supervi-vència	A+B Fresc	A+B Crio,	Supervi-vència	A+B Fresc	A+B Crio,	Supervi-vència	A+B Fresc	A+B Crio,	Supervi-vència
64,37%	30,66%	47,63%	38,10%	20,77%	54,51%	50,20%	31,58%	62,91%	62,26%	25,00%	40,15%
51,72%	30,51%	58,99%	37,63%	24,68%	65,59%	44,08%	12,26%	27,81%	61,11%	24,15%	39,52%
50,00%	15,04%	30,08%	54,27%	13,46%	24,80%	63,06%	31,37%	49,75%	73,03%	39,04%	53,46%
56,67%	37,50%	66,17%	46,15%	22,18%	48,06%	75,59%	22,62%	29,92%	73,03%	37,50%	51,35%
47,78%	23,78%	49,77%	54,27%	25,00%	46,07%	43,46%	27,08%	62,31%	37,90%	28,31%	74,70%
59,57%	39,42%	66,17%	54,27%	30,39%	56,00%	79,37%	26,11%	32,90%	84,11%	38,64%	45,94%
55,13%	20,00%	36,28%	58,29%	25,64%	43,99%	74,59%	28,79%	38,60%	30,86%	15,91%	51,56%
36,89%	22,55%	61,13%	56,37%	25,60%	45,41%	63,86%	42,58%	66,68%	54,00%	23,53%	43,57%
41,18%	4,35%	10,56%	71,43%	43,21%	60,49%	45,13%	19,38%	42,94%	57,37%	29,10%	50,72%
50,74%	28,16%	55,50%	72,57%	17,76%	24,47%	52,33%	34,81%	66,52%	47,19%	26,76%	56,71%
37,23%	23,72%	63,71%	39,04%	4,30%	11,01%	60,30%	42,14%	69,88%	60,49%	39,89%	65,94%
62,86%	47,10%	74,93%	59,74%	20,93%	35,04%	60,30%	36,41%	60,38%	62,36%	15,73%	25,22%
50,48%	19,90%	39,42%	51,04%	7,48%	14,66%	68,07%	11,54%	16,95%	63,90%	23,70%	37,09%
40,00%	3,92%	9,80%	59,84%	25,60%	42,78%	58,54%	15,00%	25,62%	50,46%	17,98%	35,63%
41,32%	29,23%	70,74%	85,71%	27,27%	31,82%	70,97%	20,35%	28,67%	57,95%	8,00%	13,81%
81,32%	46,28%	56,91%	19,62%	7,18%	36,60%	52,31%	31,92%	61,02%	53,03%	25,09%	47,31%
61,59%	29,72%	48,25%	52,96%	30,00%	56,65%	70,83%	35,75%	50,47%	38,73%	21,43%	55,33%
38,11%	5,82%	15,27%	70,33%	14,13%	20,09%	35,00%	15,27%	43,63%	78,79%	38,52%	48,89%
52,05%	13,35%	25,65%	39,92%	16,67%	41,76%	25,23%	14,15%	56,08%	78,00%	44,26%	56,74%
43,83%	29,41%	67,10%	42,31%	20,00%	47,27%	39,13%	29,03%	74,19%	50,75%	38,05%	74,98%
40,00%	26,86%	67,15%	56,70%	20,97%	36,98%	64,71%	22,54%	34,83%	37,14%	15,15%	40,79%
50,00%	26,67%	53,34%	45,45%	20,50%	45,10%	53,85%	6,56%	12,18%	69,57%	48,50%	69,71%
39,44%	8,28%	20,99%	45,45%	20,69%	45,52%	80,00%	48,46%	60,58%	57,93%	18,53%	31,99%
51,78%	25,70%	49,63%	47,60%	18,43%	38,72%	68,42%	20,34%	29,73%	56,95%	12,75%	22,39%
40,14%	7,09%	17,66%	32,26%	18,66%	57,84%	61,64%	34,78%	56,42%	27,95%	5,21%	18,64%
42,47%	11,18%	26,32%	59,02%	32,96%	55,85%	68,16%	33,33%	48,90%	77,27%	37,13%	48,05%
46,95%	13,52%	28,80%	48,72%	27,60%	56,65%	49,58%	14,67%	29,59%	68,72%	35,51%	51,67%
37,11%	16,80%	45,27%	64,47%	13,70%	21,25%	68,89%	35,51%	51,55%	59,43%	22,52%	37,89%
42,06%	11,86%	28,20%	37,24%	7,04%	18,90%	63,11%	20,49%	32,47%	54,74%	25,00%	45,67%
32,46%	20,27%	62,45%	50,99%	13,73%	26,93%	60,76%	41,56%	68,40%	60,00%	33,33%	55,55%
25,98%	7,04%	27,10%	36,58%	18,21%	49,78%	55,13%	30,78%	55,83%	41,83%	31,30%	74,83%
62,34%	20,28%	32,53%	36,42%	25,46%	69,91%	50,15%	11,80%	23,53%	55,96%	18,84%	33,67%
35,87%	23,37%	65,15%	43,46%	27,08%	62,31%	75,89%	24,31%	32,03%	57,47%	36,11%	62,83%
35,87%	12,50%	34,85%	36,59%	5,34%	14,59%	49,78%	32,82%	65,93%	48,29%	18,08%	37,44%
51,43%	18,57%	36,11%	81,18%	57,93%	71,36%	53,51%	3,00%	5,61%	57,29%	29,49%	51,47%
38,10%	12,50%	32,81%	48,87%	28,49%	58,30%	45,90%	20,19%	43,99%			

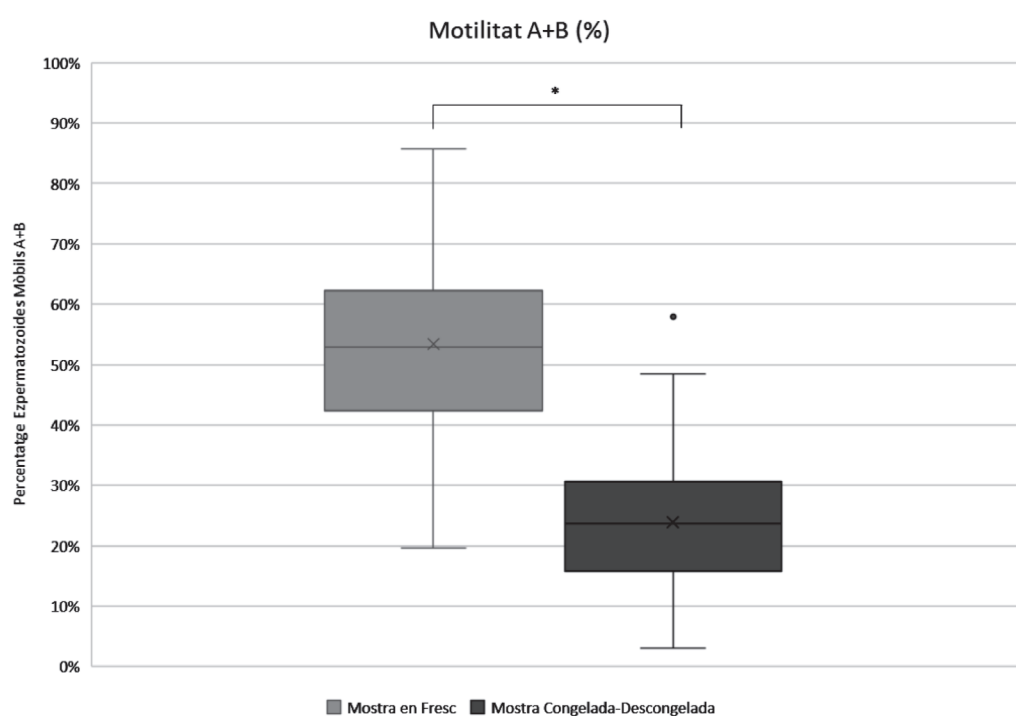


Figura 1. Representació gràfica del comptatge d'espermatozoides amb mobilitat de tipus A + B en les mostres abans de congelar i descongelar i després de congelar-descongelar. * $P < 0,01$.

Taula 3. Taxa de supervivència d'espermatozoides mòbils.

Supervivència Espermatozoides Mòbils	
Mitjana ($\pm$ SEM)	44,7% ($\pm$ 1,4)
Moda	62,3%
Mínim	5,6%
Màxim	74,9%

La Figura 2 mostra la taxa de supervivència d'espermatozoides mòbils de les 143 mostres analitzades agrupada per rangs de percentatge de mòbils recuperats. S'observa que, en la majoria de mostres, sobreviuen entre un 40 i un 60% dels espermatozoides mòbils en fresc.

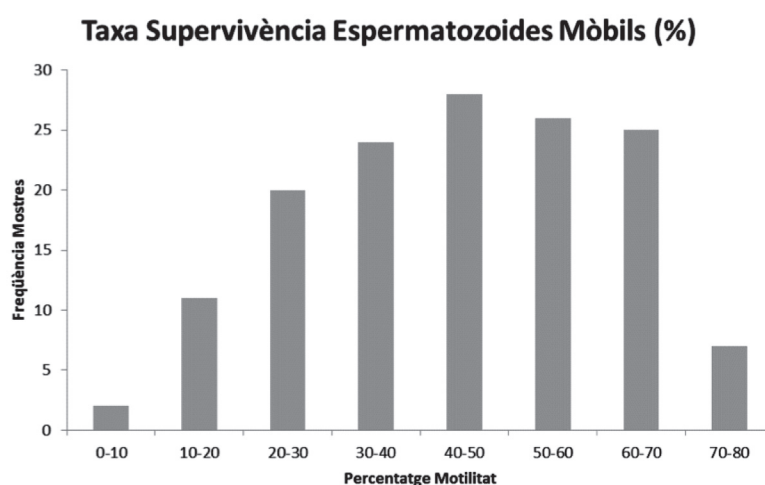


Figura 2. Taxa de supervivència d'espermatozoides mòbils post-descongelació segons freqüència.

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

La criopreservació de les mostres seminals té un efecte deleteri en els espermatozoides humans. En les mostres descongelades s'observa una disminució del percentatge d'espermatozoides mòbils i un augment dels espermatozoides immòbils (Ozkavukcu *et al.*, 2008); juntament a una disminució de la viabilitat espermàtica (Boitrelle *et al.*, 2012). A més, s'observa una alteració en la morfologia dels espermatozoides (Lee *et al.*, 2012) i en la proteòmica espermàtica (Bogle *et al.*, 2017).

En aquest estudi hem seleccionat mostres normozoospermiques per evitar que la qualitat intrínseca de la mostra seminal influís en la supervivència post-descongelació.

En aquest estudi es confirma la disminució del percentatge d'espermatozoides mòbils detectada en la literatura científica revisada, que passa de ser del 53,4% abans de criopreservar la mostra al 23,9% després de descongelar-la. No obstant, la taxa de supervivència d'espermatozoides mòbils obtinguda és del 44,7% front al 35% que es marca com a taxa desitjable en els quaderns d'embriologia clínica publicats per ASEBIR (Cuadernos de Embriología Clínica VI., 2016).

A pesar d'estudiar mostres normozoospermiques, encara s'observa una gran variabilitat en la supervivència dels espermatozoides mòbils descongelats. Malgrat la variabilitat interindividual pròpia de les mostres biològiques, atribuïm aquest fet a la tècnica de criopreservació, que podria ser millorada.

Atesa aquesta variabilitat interindividual considerem que els controls post-descongelació de les mostres segueixen essent necessaris ja que a partir d'aquests resultats no es pot preveure amb exactitud la taxa de supervivència i el percentatge d'espermatozoides mòbils en el moment de la descongelació.

Per altra banda, aquests estudis permeten determinar uns valors òptims amb els quals establir un control de qualitat dins el laboratori i permetran valorar la tècnica i el protocol de criopreservació i descongelació.

De cara al futur, seria interessant analitzar si els espermatozoides mòbils que han sobreviscut presenten efectes negatius degut a la congelació-descongelació, com ara una major fragmentació del DNA (Zribi *et al.*, 2012).

També seria interessant realitzar estudis per determinar si una baixa supervivència d'espermatozoides

post-criopreservació pot afectar l'èxit d'un tractament de reproducció assistida malgrat siguin mostres normozoospermiques en origen, o si el desenvolupament embrionari es modifica segons s'usi mostra congelada o mostra fresca en les inseminacions d'òcits.-

BIBLIOGRAFIA

- ASEBIR (2016) Cuadernos de Embriología Clínica VI. Indicadores de calidad del laboratorio de embriología: definición y especificaciones. ISSN: 1888-8011.
- Bogle, O., [et al.] (2017). «Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process». *Androl*, vol. 5, p.10-22.
- Boitrelle, F., [et al.] (2012). «Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation». *J Androl*, vol. 33, núm 6, p.1371-1378.
- Fabozzi, G., [et al.]. (2016). «Evaluation of the Efficiency of Two Different Freezing Media and Two Different Protocols to Preserve Human Spermatozoa from Cryoinjury», *Int J Reprod Med*, vol 2016, p.1-6.
- Lee, C., [et al.]. (2012). «Kruger strict morphology and post-thaw progressive motility in cryopreserved human spermatozoa» *Androl*, vol. 44, núm 1, p.81-86.
- Omnes C., [et al.] (2013). «Human spermatozoa cryopreservation: comparison of three different freezing protocols», *Cryo Letters*, vol. 34, núm 5, p. 535-543.
- Ozkavukcu, [et al.]. (2008). «Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa», *J Assist Reprod Genet*, vol.25, núm 8, p. 403-411.
- Rofeim, O., [et al.] (2005). «Long-term effects of cryopreservation on human spermatozoa». *Fertil Steril*, vol. 84, núm 2, p. 536-537.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed. ISBN 978 92 4 154778 9.
- Zribi, N., [et al.]. (2012). «Cryobiology Effect of freezing – thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity». *Cryobiology*, vol. 65, núm 3, p. 326-331.

