



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

V^ { æ	Úi * ā æ
FÈR • cāāāā	I
GÈT æ& Á 5iā	î
HÈÚ æ cæ ā} d Å^] : à ^ { æ	GF
I ÈPā 5c•ā	GG
Í ÈU àbā	GH
Í ÈÁ àbā [Á ^ } ^ æ	
Í ÈÁ àbā [^ •] ^ āā	
Î ÈT æ ā • Á Á . d ā •	G
Î ÈÁ ā ^ fi [Å ^ Á • c ā ā	
Î ÈÁ [à āā } Á Á ~ ^ • d æ	
Î ÈÁ ~] [• Å ^ Á • c ā ā	
Ï ÈÔ æ ā • Å ^ Á ^ ^ āā	G
Ï ÈÔ æ ā • Å ^ ā & ~ • ā	
Ï ÈÔ æ ā • Å ^ Á c & ~ • ā	
Ï ÈÔ æ ā • Å ^ Á ā ā āā	
Ì ÈQ • d { ^ } d • Á Á [& āā ā } d •	GJ
J ÈÜ ^ • ~ āā [•	HÈ
F ÈÈ Ö ā & • ā	I H
FF ÈÈ Ô [} & ~ • ā	I ì
FG ÈÈ Ó ā ā * āā	Í €

JUSTIFICACIÓN

ŠaÁ ^ç[| &ñ) Á à^Á |aÁ &ā àā || * ðÁ @aÁ & } • ^ ~ ñ[^ • aae|^&^!Á] | & àā ā } ç •
|æ [} aae|^ ^) ç^ Á aae^ Á aae^|aÁ & ā] | ^ • ^ | ç aaeñ) Á^ Á •] ^ | { aae : [ñ^ • Á @ { aae [• É
• ā Á { àa* [Á | • Á^ • & ç • Á à^ Á | aÁ & | } * ^ | aaeñ) Á^ Á | aae^ • & } * ^ | aaeñ) Á^ ā ~ ^) Á • ā } à |
|^ aae^ • É ù | } Á [& &ñ] [&ñ • Á | • Á ç ^) ç • Á • aae } • Á aae ~ ~ ç aae } • Á ~ ^ Á & || ^) Á ~ | aae ç
| aae } * ^ | aaeñ) É aae (aae) aae ā } ç Á Á^ • & } * ^ | aaeñ) Á^ Á | Á •] ^ | { aae : [ñ^ É aae ò &ñ { [|
| • Á .. ç à | • Á aae^ ç & aae Á | Á aae | • Á aae | • Á aae * .. } aae | É ò • Á^ Á • ç Á [à | &ñ { [Á aae & . | | aae
• [à | ç aae ā } ç • Á | ~ ^ à ^) Á ~ ~ à Á^ • ā } ^ • Á • ç & ç | aae^ • Á^ Á & aae à ā • Á ^ aae | aae } • Á ~ ^
| ā aae Á • ~ ~ } &ñ) Á à ā | 5 * aae Ò aae @ • Á^ • & ç • Á [& || ^) Á ā & } • [Á • aae | Á] ^ | ā à | Á à^
& } * ^ | aaeñ) Á • Á ~ ^ &ñ | ç É | Á | Á ~ ^ Á^ • ~ | aae &ñ ^ ç aae | ^ • É

Ò!Á àò aae [Á^ Á &ñ aae ~ ā | Á | | ç &ñ || Á^ Á &ñ } * ^ | aaeñ) Á • Á | ^ ç ^) ā Á aae | | { aaeñ) Á^ aae à^
& ã aae^ • Á à^ Á @ | | Á ā ç aae | | aae É &ñ } ç | aae * | aae à^ • Á ~ & ç aae } ^ • Á^) Á ~ Á ç | | { ^) Á
|^ à ~ & ã Á | Á aae | Á^ Á aae ^ { à | aae aae ~ ^ Á aae {] aae aae | Á aae à ā • Á^ Á aae ^ Á ā ~ &ñ [• Á | |
| aae Á aae Á^ {] ^ | aae | aae É V aae à ā . } Á • Á aae } &ñ } [&ñ [Á ~ ^ Á aae } Á •] .. &ñ ^) Á^ Á^ ^ ^)
aae } ^ Á } aae &ñ aae aae Á aae Á^ Á^ | ç ā aaeñ) Á aae ç • Á^ Á &ñ } * ^ | aae É | aae &ñ aae aae Á [Á^ | |
{ ^ ç | Á^ Á^ • &ñ } * ^ | aae Á aae @ aae ~ ^ • ç aae

Qç) ç • Á | aae^ (aae ā ā aae | aae [à | ç aae ^) &ñ Á à^ Á | [• Á •] ^ | { aae : [ñ^ • Á ~ ^) ç Á aae ~
à^ • &ñ } * ^ | aaeñ) É @ aae | ^ ç aae | Á aae Á^ • aae | | | Á^ Á &ñ ā] | | ç & ç | ^ • Á &ñ } Á^ ç) • [| ^ • Á aae
&ñ } ç | aae Á aae | aae } ^ • Á^) Á | [• Á • | ç ^) ç • Á • • [| ç • Á ā ç aae Á^ ç aae | | aae Á aae ò &ñ { [|
[à ç] ^ | Á ~ ^ • ç aae &ñ } Á ^ ç | Á aae aae Á Á aae | Á aae {] [Á^ Á aae (aae) aae ā } ç É

Š | • Á • ç ā ā • | ^ aae aae [Á^ • à^ Á | Á aae &ñ Á^ Á aae } • ^ | ç aaeñ) Á^ Á •] ^ | { aae : [ñ^ • É |
{ ~ ^ • ç aae Á aae | aae } ^ • &ñ [{ [• 5 { aae Á ç aae Á | aae &ñ ā] | ^ • ^ | ç aaeñ) É Ò aae aae | aae à aae
ā &ñ ^) &ñ Á à^ Á | [• Á^) 5 { ^) [• Á ~ ^ Á] ~ à ā | aae | Á^ • ā } aae Á | Á aae | aae^ ^) .. aae É • Á @
&ñ &ñ | aae [Á ~ ^ Á | [• Á •] ^ | { aae : [ñ^ • Á [à | ç aae &ñ } • ^ | ç aae^ Á^ | aae ç Á ~ & @ • Á aae | • Á ā
| ā • * [aae | ^ &ñ | aae à^ Á ~ aae } ^ • É ù ā Á { àa* [Á^ • ç Á | ^ • ç | ^ | aae } aae [Á &ñ] Á aae
^ • &ñ aae Á^ Á^ •] ^ | { aae aae Á &ñ } à aae É | | ^ • ç ç aae } ç | ^ | aae } aae [&ñ] Á aae

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN.

Šaeŋ -i q̄āāāÁ^Áā-ā^Á& [[Áaeŋ &aē aēāāÁ] aēaē [*!aēÁ } Á{ àaēaē [Á^] Á aē^aē
~^Á|Á^aē Áā • &] ā [[Á [!Áā [&Á^ ^•^•Á•ā Ác^] ^!Áaē* g) Á .d̄ ā [Áaē aē] &^] aē [È
Ò• aēò aēaē ^] c^Áaē -i q̄āāāÁ•Á } aēaē -i { ^aāāÁ~^Áē~^aēaēÁÍ ÁaēÁ Áā |aē
] aē^aē Èā^Á•c^Á [!&^] aē { 1• [Á^] [Á^Á Á Ē Áā^Áaē^&•Áaē -i q̄āāāÁc^] ^
& { [Á!ā^] Áaēaē ~ b:ÈÁ|Á Ē Áaēaē5) ÁÁ|ÁĒ Á•aē c^ÁāÁ [Áaē [•Á^Á -i q̄āāā
• [] Áaē •aē [Á [!Áaē |^•Á^ aē &] ā [ÁÁ^ { ^ } ā [Á^ : &aē [Á È Áaē -i q̄āāāÁā
[!ā^] Áā • &] [&aē [Á^ Áē~^aēaēÁÍ Ē Áā^Á•aē Á aē^aē È

Ö^] d [Áā |aē Áē •aē Áā { ^ } ā aē ā^Á -i q̄āāāÁā^āā [!ÁāÁaē aēāÁ] Á [!ā { aē
@! { [] aē •È } ā [&ā [•ÁāÁaē ~ b:Á Áaē daē aēāÁ•Á& {] aēaēaē [!Áaē |^•
aē aē5 { aē •Á } d^Á [Á^ Áā^Áā c̄ *^] Áaē à•d̄ &&5) Áā àaēaēÁaē] ā [^d̄ •ā Áaē
aē@!^] &aē Á ..çaē ÈÖ: āā [!ÁāÁ } Á Ē ÁāÁ [•Áaē [•Á^Á -i q̄āāāÁāÁ |ā^]
^ { ^ } ā [Á^ ā^Áā] ^!Á [[Á!ā^] Á|Ác^! È

Ö^|Á aēÁā [•Áaē [•Á^Á -i q̄āāāÁāÁ |ā^] Á aē &] ā [Áaē aē [!Á aēc^Áā] || •Á^
{ aē āā •aēÁ } Á } Á•c̄ āā Áā^Á { ^ } Á [!Ác^!aē] ^•Á } Áaēaē aēāÁ [çaēāāÁaē
-i { aēāÁā [•Á•] ^! { aē : [aē •ÈÖ•aē Ád^•Áçaēaē^•Áaē &aēaē Á] ~^ā^ } Ác^] ^!
[!ā^] ^•Áaē aē5 { aē •È } ^&& [•È^] ā [&ā [•È& [{ [•5 { aē •Á aē } ā • &] [&aē [•È

Ò) Á|Áaē [Á^Á aē^Á Áaē -i q̄āāāÁ aē &] ā aēÁ~Áaē aē ā } d̄ • [] ^!Á [&•aē ā] d̄
^Á |^•^!çaēaē Áā |Á•] ^! { aē [•Á~] d̄ •Á } āaē ^] aē^Áaē aēāÁaē aēā aēÈ

Bases biológicas.

citoplásmica hasta cerca del final de la diferenciación espermática. Consecuentemente, las células germinales en desarrollo están conectadas por puentes citoplásmicos en un sincitio. Este arreglo sincitial permite a la espermatogonia diploide producir proteínas y materiales celulares para el espermatozoide haploide. Entonces, el espermatozoide entra en el epidídimo, donde su superficie es reorganizada por secreciones absorbentes del epidídimo y por procesos internos. ⁴

El donador.

La donación de espermatozoides es el acto mediante el cual un varón cede voluntariamente, en general de manera anónima y gratuita su semen para ayudar a otras personas que no pueden procrear por la vía natural y lo necesitan para ser utilizado en un proceso de reproducción asistida. La donación de espermatozoides es utilizada tanto en la inseminación intrauterina con donante, como en la fecundación in vitro con donante.

La donación de espermatozoides no es algo nuevo. Las primeras donaciones anónimas de espermatozoides en tratamientos médicos de fertilidad se hicieron al inicio de los años 1970. Normalmente se realiza un contrato de donación entre el donante y los receptores. Para realizar la donación se debe estar en edad fértil y demostrar ser completamente sano. La inseminación con espermatozoides de donante anónimo produce cientos de miles de nacimientos al año desde los años '80. Sólo en Estados Unidos genera más de diez mil nacimientos al año. (Los donadores de espermatozoides a través de tres décadas: motivaciones y actitudes. Bjørn Bay, et. al Department of Obstetrics and Gynecology, Aarhus University Hospital; 2014).

La fertilización.

Cuando los espermatozoides entran en el aparato reproductor femenino, experimentan el proceso de capacitación. Durante la capacitación, las proteínas y lípidos de la membrana espermática cambian, incluida la liberación significativa de colesterol de membrana, en preparación para la interacción con el ovocito. El espermatozoide penetra la capa de células del cumulus que rodea al ovocito mediante su motilidad hiperactivada, como consecuencia de la capacitación y de hialuronidasa enlazada a la superficie del espermatozoide por un ancla de glucosilfosfatidil-inositol. La movilidad espermática y la actividad de la hialuronidasa permiten al espermatozoide moverse a través de la matriz extracelular del cumulus para alcanzar la zona pelúcida. Al alcanzar esta zona, el espermatozoide capacitado efectúa la “reacción acrosomal”, un proceso esencial para la fertilización. ⁴

El acrosoma es un gran gránulo secretorio que contiene proteasas y hialuronidasas. En la reacción acrosomal, la membrana externa del acrosoma se fusiona con la membrana plasmática del espermatozoide y los contenidos del primero se vacían. La fertilización incluye, al menos, dos pasos claves iniciales: la interacción y penetración de la zona pelúcida por el espermatozoide, y la fusión de las membranas del espermatozoide y del ovocito. La zona pelúcida es una capa gelatinosa, no celular, compuesta por glicoproteínas y cuyas funciones principales son el reconocimiento espermático especie-específico (evita la fertilización por espermatozoides no humanos) y la prevención de la polispermia (sólo un espermatozoide podrá fertilizar). El espermatozoide penetra la zona pelúcida, en parte, por el impulso mecánico proporcionado por el flagelo y las enzimas hidrolíticas secretadas por el acrosoma, que causan interrupción de la continuidad de la zona pelúcida.

Cuando las membranas del espermatozoide y el ovocito se fusionan, ocurre la despolarización de la membrana plasmática del ovocito, que actúa como el bloqueo primario para la polispermia. Posteriormente, se activa la vía de señalamiento celular inositol fosfolípido, que incrementa la concentración de calcio citosólico e induce a los gránulos corticales submembrana para liberar sus contenidos. Los

contenidos cambian la cubierta glucoproteica de la zona pelúcida, con la finalidad de prevenir la unión de espermatozoides. ⁴

Mecanismo de lesión del espermatozoide

El funcionamiento de la célula y a las alteraciones que en ella provoca el estrés oxidativo, que esconde una de las grandes paradojas del metabolismo de los seres vivos: mientras la gran mayoría de la vida compleja requiere del oxígeno para su existencia, el oxígeno es, a su vez, una molécula altamente reactiva que daña las células. La oxidación, un fenómeno imprescindible para la vida. La oxidación es un fenómeno natural e inevitable, gracias al cual es posible la vida. Para el funcionamiento de nuestras células se requiere oxígeno. Los organismos aerobios extraen energía de la glucosa que obtienen de sus alrededores al oxidarla con el oxígeno del aire que respiran. El metabolismo –el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos fisicoquímicos que ocurren en una célula- está fundamentado en los procesos de oxidación y de reducción. Oxidación es el proceso químico por el que un átomo pierde electrones, convirtiéndose en inestable. Reducción es el proceso por el que el átomo adquiere electrones, estabilizándose. Ambos fenómenos guardan habitualmente un equilibrio. ⁵

Es posible detectar cambios apoptóticos en las membranas plasmáticas y mitocondriales de fracciones seminales con baja motilidad de pacientes infértiles. Recientemente, la determinación de radicales libres ha tomado particular interés porque pueden estar involucrados en el mecanismo del daño al espermatozoide en situaciones de infección, traumatismo o autoinmunidad. ⁶

El mecanismo más importante de producción del daño en el ADN del espermatozoide puede ser la presencia de un empaquetamiento anómalo de la cromatina, debido a una protaminación insuficiente, y a la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) y apoptosis. La presencia de radicales libres de oxígeno ha

merecido una atención especial, tanto por su papel en la fisiología como por su implicación en las enfermedades de la reproducción humana. La presencia de estrés oxidativo tiene lugar cuando hay una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno por parte de los leucocitos o por los espermatozoides anormales y/o se produce una disminución de la capacidad antioxidante del semen. En diversos estudios se ha descrito que la presencia de radicales libres de oxígeno es una causa importante de lesión en el ADN del espermatozoide.⁵

Son muchas las posibles causas de daño al DNA espermático, incluyendo apoptosis, estrés oxidativo asociado con infecciones del tracto genital, exposición a agentes químicos, y/o defectos de la espermatogénesis asociada con la retención de citoplasma residual excesivo.⁷

Las técnicas de reproducción asistida se han transformado en el tratamiento de elección en casos de infertilidad femenina y masculina, pero sin embargo las tasas de embarazo permanecen en niveles subóptimos en los casos de factor masculino severos. La calidad de los espermatozoides es uno de los factores que determinan el éxito de las técnicas de reproducción asistida.⁸

La infertilidad

La infertilidad es un problema común que afecta a una de cada seis parejas. Puede ser definida como la incapacidad de completar un embarazo luego de un tiempo razonable de relaciones sexuales sin tomar medidas anticonceptivas. Las causas del incremento en la prevalencia de la infertilidad son difíciles de establecer. Este aumento podría deberse por lo menos a cuatro factores: postergación del momento en que se decide tener hijos, alteraciones en la calidad del semen debido a hábitos como el tabaquismo y el alcohol, cambios en la conducta sexual y eliminación de la mayoría de los tabúes. El estudio de la pareja infértil siempre se ha enfocado

considerando diferentes factores: el ovulatorio (presente en alrededor de 30% de las parejas), el útero-tubárico-peritoneal (se observa alrededor de 20% de las parejas), el de migración del semen (10% de los casos) y el masculino (30% de las parejas). Cerca de 40% de todas las parejas infértiles presentan una combinación de factores y aproximadamente el 15% no evidencia ninguna alteración objetiva que lleve a un diagnóstico definido. ⁹

Tratamiento.

El primer informe de la utilización de la fertilización in vitro es debido a Pincus, trabajando con conejos en 1930. En 1953 se informa el primer nacimiento de un niño por inseminación con semen congelado por Bunge y Sherman. En 1955 se llevó a cabo el Primer Congreso Mundial sobre Esterilidad y Fertilidad. En el año 1964, en las recomendaciones del IX Congreso Internacional de Derecho Penal, celebrado en La Haya, se planteaba que las leyes nacionales reconocieran el aborto legal y la posibilidad de la inseminación artificial con consentimiento de los esposos. ⁹

El nacimiento en Inglaterra en 1978 del primer "bebé probeta" constituyó un momento culminante para la ciencia. A partir de ese momento, miles de parejas se han beneficiado con el empleo de esta y otras técnicas de reproducción asistida. En 1984 se realizó la primera transferencia de un embrión al útero de otra mujer que no era la madre genética en Los Ángeles (EEUU) por Boston.

Todo esto ha traído como consecuencia que en los países en los cuales comenzaron a aplicarse tales técnicas surgieran numerosos problemas ético-legales, que han hecho necesario modificar las legislaciones existentes, o incluso la creación de nuevas leyes, que regulen diversos aspectos de la filiación, la herencia, la paternidad, el derecho de familia e incluso, el derecho a la vida. ¹⁰

La inseminación terapéutica con semen de donante.

Se utiliza mundialmente para tratar a parejas con azoospermia, o infertilidad masculina severa, en parejas que portan enfermedades genéticas conocidas que pueden transmitirse a través de los espermatozoides del varón, o en mujeres solteras. Los bancos de semen con donantes anónimos han representado un aspecto importante de la medicina reproductiva durante décadas. En la actualidad, y desde el advenimiento del ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides) y de los diferentes procedimientos quirúrgicos para obtención de espermatozoides epididimarios y testiculares, muchos pacientes con azoospermia o infertilidad masculina severa recurren a estos procedimientos antes de recurrir a la inseminación terapéutica con semen de donante. Los resultados reproductivos para prueba de embarazo positiva con la inseminación terapéutica con semen de donante son de 12.3% por ciclo y 38% por paciente para un grupo de mujeres con edad promedio de 33 años y un promedio de 2.4 inseminaciones por paciente (Don P. Wolf et al; 2001 University Fertility Consultants, Portland, and Women's Care Fertility Center, Eugene, Oregon).

Evaluación de donantes: Las principales características a observar en la selección del donante para ITD son ¹¹.

1. La ausencia de enfermedades infectocontagiosas sexuales.
2. Ausencia de enfermedades hereditarias familiares conocidas por el donante.
3. El donante debe ser mayor de 18 y menor de 50 años.
4. Estado de salud psicológico y físico adecuado.
5. Poseer un semen con características suficientes para sobrevivir a la congelación con garantías.

Screening del semen: Se sugiere que se examinen varias muestras (abstinencia de 2 a 3 días) antes de proceder con una evaluación más amplia. La muestra debe ser

examinada dentro del período de 30 minutos a una hora posteriores a la eyaculación en un recipiente estéril. Los criterios utilizados para juzgar la normalidad de la muestra varían de laboratorio a laboratorio, pero en general se utilizan los establecidos por la OMS¹²:

- Mayor volumen: > 1.5 ml.
- Mayor motilidad espermática: 32% con movimiento activo en dirección progresiva.
- Mayor concentración espermática: 15×10^6 de espermatozoides móviles/ml.
- Mayor morfología espermática: > 4 % morfología normal.
- Mayor crio-sobrevida: 50% de movilidad inicial.

Los criterios de selección de donadores de esperma en el banco de semen del Centro de Fertilidad IECH se comentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Criterios de selección de donadores, en base a parámetros espermáticos.

Volumen	>2 ml
Cuenta total motil pre capacitación	> 100 millones
Cuenta total motil post capacitación	>70 MILLONES
Vitalidad	>80 %
Ph	8.0 - 8.5
Morfología kruger	> 4%
Fragmentación de DNA	<12 %

La prueba de descongelación se realiza a una dilución 1:3 (para obtener mínimo tres viales, siguiendo las especificaciones del protocolo Crioprotect II Nidacon), cada 1 ml (1 vial) debe contener 40 millones totales, para que posterior a realizar el lavado se obtenga una muestra con una CTM de 20 millones.

En la primera entrevista se recomienda que el donante se someta a un examen físico que incluya la evaluación de flujo uretral y se descarte la presencia de verrugas o úlceras genitales, así como realizar el screening de laboratorio de rutina,

antes de reclutarlo en el programa^{11,13}. También se recomienda realizar el escrutinio completo de enfermedades infecciosas, tal como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Pruebas de laboratorio recomendadas en la selección de donadores de espermatozoides.

VDRL	Obtener inicialmente en sangre; no repetir el estudio a menos que exista una indicación clínica.
Virus	
hepatitis B, y hepatitis C.	Obtener inicialmente y repetir cada seis meses.
Antígenos de superficie	
Neisseria gonorrhoeae	Cultivos en semen, orina o uretra para obtener inicialmente y repetir cada 6 meses o más frecuentemente si existe indicación clínica.
Chlamydia trachomatis	
Citomegalovirus (CMV)	Si son positivos (IgG) se sugiere utilizar solamente con receptoras que sean positivas para CMV. Repetir cada 6 meses y no utilizar muestras con cuarentena si el donante desarrolla un título de anticuerpos sugerentes de enfermedad reciente con CMV (IgM).
Anticuerpos séricos	
Anticuerpos séricos para HIV	Un resultado positivo deberá confirmarse con la técnica Western Blot antes de notificárselo al donante. Si el estudio es negativo se pueden obtener muestras de semen para criopreservación. El donante debe ser testeado nuevamente en 180 días para HIV, y las muestras se liberan para uso, sólo si los resultados son negativos.

Criopreservación

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas. La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo *biológico* es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones. Sin embargo,

este no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar.¹²

La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia de la célula congelada. Los periodos críticos para la sobrevivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas.¹⁵

Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación en general debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, la transición de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura de 10°C - 16°C alterando de esta manera las funciones de la membrana y dándole un alto grado de fragilidad, durante la deshidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación se puede presentar una pérdida de lípidos lo cual afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas.¹⁶

Transporte a través de las membranas durante la congelación y descongelación

Las bajas temperaturas (asociadas al aumento de la rigidez de la membrana) y la rapidez (décimas de segundo) con la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hacen muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana mediante procesos de transporte activo (dependientes de ATP), la disminución de temperatura desde 25°C a 10°C reduce en un 60% la actividad de las bombas dependientes de ATP y la difusión facilitada

o como transporte (transporte concomitante de dos moléculas a través de la membrana dependiente una de ellas de ATP y/o iones H⁺), en consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico.¹⁸

La difusión es un proceso mediante el cual las moléculas de una sustancia tienden a alcanzar una distribución homogénea en todo el espacio que les es accesible. La ósmosis es un caso especial de difusión en el que es el movimiento del disolvente el que se estudia, y se define en función de los solutos. La ósmosis es el movimiento del agua desde soluciones con baja concentración de soluto hasta soluciones con alta concentración de soluto y la presión osmótica es la presión hidrostática que se genera a través de una membrana semipermeable con un gradiente de concentración al lado y lado, depende del número de partículas de la solución.¹⁷

La lesión celular crio inducida se explica en función de la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación, Merryman propone la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la congelación (choque osmótico), el volumen celular mínimo se basa en que el volumen se reduce en relación al aumento de la osmolaridad extracelular, a medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad, en este caso los crioprotectores actuarían reduciendo por sus propiedades coligativas la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada.¹⁹

Congelación de espermatozoides

A pesar de que los espermatozoides fueron los primeros tipos de células criopreservadas,²⁰ intentos de mejoramiento para su criopreservación son objeto de investigación, principalmente por la pobre sobrevivencia de estas células en pacientes con infertilidad y problemas oncológicos. No hubo avances significativos hasta el descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol en espermatozoides de toro, abriendo así una opción viable para campos como la reproducción asistida en humanos. El éxito relativo de la criopreservación del semen ha mostrado avances significativos en el intercambio internacional de animales genéticamente superiores, biotecnología, conservación de especies en extinción y medicina reproductiva humana.

La criopreservación de espermatozoides humanos ha evolucionado empíricamente, usando tasas de congelamiento de hasta 100-200°C/min y medios basados en glicerol con citrato de yema de huevo, sin embargo otros estudios sugieren tasas de sobrevivencia exitosa utilizando etilenglicol.²¹ Sin embargo, estos protocolos deben ser re-examinados con estrecha atención al daño causado por la criopreservación.

La caracterización de la criobiología del espermatozoide se empezó hace aproximadamente veinte años, determinando diferentes parámetros de los espermatozoides, entre ellos los cambios bioquímicos, estatus energético, integridad de la membrana, temperatura de transición de fase de la membrana lipídica, integridad de elementos subcelulares y morfología de acrosoma.²²

Los principales problemas incluyen tasas de enfriamiento no uniformes entre alícuotas del mismo eyaculado y dificultades en mantener reproducibles las condiciones de congelación. Congeladores programables en los cuales circulan los vapores de nitrógeno líquido en una tasa controlada permiten curvas de enfriamiento más reproducibles, permitiendo mantener las temperaturas para hacer el *seeding* manual.²³

Estudios más recientes han sugerido que la permeabilidad de la membrana espermática a temperaturas supracero es más alta que la de otros espermatozoides de mamíferos. Esta alta permeabilidad puede ser por la presencia de proteínas que forman canales selectivos para el agua; se ha sugerido que las células con alta permeabilidad al agua y baja energía de activación (< 6-7 kcal/mol) tienen canales específicos para el agua o aquaporinas (AQP), siendo esta una explicación teórica para los espermatozoides.²⁴ Se ha reportado abundante expresión de AQP7 y AQP8 en testículos. Estudios indican que AQP7 aparece solamente en estados tardíos de la espermatogénesis y está presente en pequeñas cantidades en espermatozoides maduros.

Técnicas de congelación de semen

La congelación de semen es una técnica que permite conservar y mantener espermatozoides a bajas temperaturas (196 grados centígrados), sin pérdida de su capacidad fértil, durante largos periodos de tiempo. Hay que tener en cuenta que el proceso de congelación afecta la calidad espermática, en especial a la movilidad. En principio, no hay parámetros espermáticos específicos que podamos relacionar con la supervivencia espermática. Las técnicas de congelación para muestras de donadores son: congelación en viales, congelación en pajillas, congelación en perlas.²⁵

Es preciso señalar también que durante el periodo de almacenamiento las muestras pueden sufrir alteraciones que se pueden traducir en una supervivencia nula después de la descongelación.

Medios crioprotectores

Los medios crioprotectores deben ser soluciones isoosmóticas con el plasma seminal, de semejante forma iónica, capacidad tampón y un pH cercano a la neutralidad. Existen dos tipos:

- Permeables Aquellos que entran en las células y desplazan el agua para ocupar su lugar, evitando así la formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación lenta (metanol, glicerol, dimetilsulfoxido, etilenglicol, etc.).
- No permeables Sustancias incapaces de difundir al citoplasma. Actúan como tampón osmótico favoreciendo la deshidratación celular (azúcares, lipoproteínas de la yema de huevo y proteínas de alto peso molecular).²⁵

Proceso de congelación.

- Preparación de la muestra.
- Adición del crioprotector.
- Congelación en viales.
- Envasado y almacenamiento a bajas temperaturas.

Actualmente no hay ningún artículo relacionado donde mencione el impacto de la criopreservación en la calidad de la muestra espermática exclusivamente en un grupo de donadores.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Constantemente se modifican los procedimientos de congelamiento a fin de obtener mejores resultados en los indicadores de funcionalidad espermática, para lograr de esta forma mayores porcentajes de embarazos (Stornelli et al., 2005).

Las causas más frecuentes de pérdida de la función celular producidas por congelamiento, son alteraciones de la membrana plasmática, daño mitocondrial, deterioro en la integridad del ADN y aumento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), todas con un efecto negativo sobre los indicadores esenciales para la fecundación (Desrosiers et al.; 2006; Ngmwuttiwong & Kunathikom, 2007; Yildiz et al., 2007).

Las objeciones a este proceder son las mismas que las expresadas para la inseminación con semen fresco. A estas se añade el riesgo por los efectos de la congelación-descongelación sobre el futuro embrión. Su principal ventaja está en que como medio un periodo de latencia antes de que el semen sea utilizado, es posible realizar las pruebas necesarias para el diagnóstico de enfermedades como el SIDA y la hepatitis B.

Es el objetivo del presente estudio el de evaluar el impacto de la criopreservación del semen de donador en la calidad del mismo, tomando como base el estado inicial y considerando que en ese estado de temporalidad basal, el semen se encontraba en óptimas condiciones, cumpliendo en conformidad con los criterios internacionales de selección como donante.

HIPÓTESIS

La criopreservación del esperma afecta la calidad de la muestra, disminuyendo significativamente la cuenta por ml, la motilidad, y la cuenta total motil en un grupo de donadores.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar el impacto de la criopreservación en el esperma, de la población de donadores del Instituto para el Estudio de la Concepción Humana (IECH) en el período comprendido entre noviembre del 2011 a diciembre del 2013.

Objetivos Específicos

- Determinar las variables sociodemográficas y clínicas fundamentales de los donadores.
- Determinar la calidad pre criopreservación de las muestras de semen.
- Establecer el estado de la calidad de las muestras posteriormente a la criopreservación de las muestras.
- Contrastar los anteriores resultados y determinar el impacto de la criopreservación en la calidad de las muestras espermáticas.
- Determinar las características de las muestras criopreservadas en donadores tomando como referencia el espermograma basal y la prueba de descongelación.
- Determinar el valor que de la cuenta total motil pre congelación para obtener un mínimo de 20 millones de espermas en la cuenta total motil post-congelación en las muestras de los donadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

Se realizará un estudio observacional, transversal, retrospectivo, analítico comparativo en la población de donadores del Instituto para el Estudio de la Concepción Humana (IECH) en el período comprendido entre noviembre del 2011 a diciembre del 2013.

Al acudir el donador a la primera entrevista personal, en la que se proporciona una información general del banco de semen y sobre los apartados relacionado con la donación, así como el proceso de selección. Se le entrega un test psicológico en presencia de un especialista. Acude a una 2ª cita donde se lleva a cabo un primer estudio de la muestra de semen. La muestra se considerará válida si esta tiene:

- Un mínimo de espermatozoides móviles progresivos en fresco = $80-90 \times 10^6$.
- Morfología normal según el criterio estricto de Kruger (mayor al 4%).

En caso de aceptar la prueba acudirá a una 3er cita, en la que además de repetir la valoración del espermograma completo, se analizará la capacidad del semen de sobrevivir al proceso de congelación-descongelación, se realiza también la prueba de fragmentación del DNA y se realizará un cultivo microbiológico de la muestra, para descartar *Candida albicans*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, entre otro. Para superar esta prueba, el semen debe mostrar, tras la descongelación un recuento de 20×10^6 , de espermatozoides móviles progresivos por mililitro y estar libre de gérmenes y patógenos. Además de descartar las enfermedades infectocontagiosas (VIH, VHB, VHC, VHZ, CMV, VDRL).

Comprobados negativos los análisis anteriores, el candidato deberá firmar los consentimientos informados pertinentes para utilizar las muestras, con la finalidad de lograr gestaciones.

Congelación de semen:

La congelación de semen es una técnica que permite conservar y mantener espermatozoides a bajas temperaturas (196 grados centígrados), sin pérdida de su capacidad fértil, durante largos periodos de tiempo. Hay que tener en cuenta que el proceso de congelación afecta la calidad espermática, en especial a la movilidad. En principio, no hay parámetros espermáticos específicos que podamos relacionar con la supervivencia espermática. Las técnicas de congelación para muestras de donadores son: congelación en viales, congelación en pajillas, congelación en perlas.

Es preciso señalar también que durante el periodo de almacenamiento las muestras pueden sufrir alteraciones que se pueden traducir en una supervivencia nula después de la descongelación.

Crioprotectores:

Los medios crioprotectores deben ser soluciones iso-osmóticas con el plasma seminal, de semejante forma iónica, capacidad tampón y un pH cercano a la neutralidad. Existen dos tipos:

- Permeables Aquellos que entran en las células y desplazan el agua para ocupar su lugar, evitando así la formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación lenta (metanol, glicerol, dimetilsulfoxido, etilenglicol, etc.).
- No permeables Sustancias incapaces de difundir al citoplasma. Actúan como tampón osmótico favoreciendo la deshidratación celular (azúcares, lipoproteínas de la yema de huevo y proteínas de alto peso molecular).

Proceso de congelación:

- Preparación de la muestra.

- Adición del crioprotector.
- Congelación en viales.
- Envasado y almacenamiento a bajas temperaturas.

Preparación de la muestra:

Después de recabar la muestra, se deja 30-45 minutos para su completa licuefacción. Se realiza un análisis básico de la muestra. Posteriormente se concentra mediante centrifugación a 400 g, durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante hasta el dejar el pellet diluido en un volumen de plasma de aproximadamente 1 ml. El volumen varía, si la muestra es mayor a 3 ml se diluye a 1.5 ml.

Adición del crioprotector:

Añadir el crioprotector (Nidacon ®) previamente atemperado, en proporción 1:3. Debe ser cuidadosa y realizarse lentamente (gota a gota) de manera que evitemos un choque osmótico a las células espermáticas.

Congelación en vial:

Se utilizan viales de 1 ml y los 0.3 ml sobrantes se utilizan para llevar a cabo las pruebas de descongelación.

Envasado y almacenamiento a bajas temperaturas:

Posterior a colocar la muestra en viales se deja equilibrar de 30 a 60 minutos en el refrigerador, luego se deja de 30 a 60 minutos en vapor de nitrógeno; posteriormente se pone en contacto directo con nitrógeno líquido en su bastón correspondiente previamente identificado, donde permanecerá almacenado hasta el momento de su utilización.

Descongelación:

El proceso de descongelación consiste en sumergir el vial en agua a 37° C durante 4 minutos, finalizando con la preparación, según el tratamiento que vayamos a

realizar. Si la muestra se encuentra previamente capacitada solo se lavará y concentrará la muestra, de lo contrario se realizará capacitación espermática post descongelación.

Población y Muestra

El presente estudio será llevado a cabo en el Instituto para el Estudio de la Concepción Humana (IECH) en el período comprendido entre noviembre del 2011 a diciembre del 2013.

En el estudio se incluirán a todos los donadores que cumplan en conformidad con los criterios establecidos en el presente estudio, por lo que al ser de carácter poblacional no se determinó tamaño de muestra.

Grupos de Estudio

El presente estudio incluye a todos los donadores que cumplan los criterios de selección, siendo este el grupo base único, sin embargo los datos se evaluarán y contrastarán como correlacionados, segmentado el grupo de manera pre o post criopreservación.

Posteriormente se dividieron los 36 donadores en dos grupos evaluando los mismos datos tomando como referencia la cuenta total motil normal (cuenta, movilidad, y morfología) del espermograma basal. En el primer grupo se encontraban los donadores con una cuenta total motil normal (CTMN) por debajo de 40 millones en el espermograma basal, y el segundo grupo aquellos que se encontraban por arriba de esa cifra (CTMN arriba de 40 millones).

Se realizó una segunda división de los 36 donadores para formar otros dos diferentes grupos evaluando los mismos datos ahora tomando como referencia la cuenta total motil normal x ml. en la prueba de descongelación. En el primer grupo se encontraban los donadores con una cuenta total motil normal (CTMN) por debajo de 7.5 millones x ml. en el espermograma de la prueba de descongelación, y el segundo grupo aquellos que se encontraban por arriba de esa cifra (CTMN x ml. en la prueba de descongelación arriba de 7.5 millones).

Criterios de selección.

Criterios de Inclusión:

- Donadores que acudan al Instituto para el Estudio de la Concepción Humana (IECH) en el período comprendido entre noviembre del 2011 a diciembre del 2013.
- Donadores con edad entre los 18 y los 25 años.
- Donadores con una muestra con un Volumen mayor a 2 ml.
- Donadores con una muestra que presente cuenta total motil pre capacitación > 100 millones.
- Donadores con una muestra que presente una cuenta total motil post capacitación >70 millones.
- Donadores con una muestra seminal que presente una Vitalidad >80 %.
- Donadores con una muestra seminal que presente un pH entre 8.0 y 8.5.
- Donadores con una muestra seminal que presente una Morfología (OMS) > 30%.
- Donadores con una muestra seminal que presente una Fragmentación de DNA <12 %.
- Donadores con una muestra seminal negativa a los patógenos Virus hepatitis B, y hepatitis C., *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, Citomegalovirus (CMV) y Anticuerpos séricos para HIV.

Criterios de Exclusión:

- Muestras incorrectamente manejadas.
- Muestra que por decisión posterior del donador deba ser retirada.

Criterios de Eliminación.

- Muestras incorrectamente preservadas.
- Muestras incorrectamente descriopreservadas.
- Muestras incorrectamente manejadas.

Instrumentos y Procedimientos

Se elaboró un instrumento estandarizado en donde se capturaron todas las variables en estudio, relacionados con la calidad del espermatozoides y los datos clínicos y sociodemográficos básicos; los datos serán vaciados a una base de datos desarrollada en Excel 2013 y analizados en el programa IBM SPSS Statistics 21. Se obtendrán, de todas las variables evaluadas, los estadísticos descriptivos tradicionales, tales como las medidas de tendencia central (media, mediana y moda), medidas de dispersión (varianza, desviación estándar y coeficiente de variación) y medidas de posición (cuartiles, quintiles y deciles) en el caso de las variables cuantitativas, así como las frecuencias observadas en las variables de tipo cualitativas.

Los valores de estudio serán contrastados según de manera pre y post intervención mediante pruebas de hipótesis para medias y proporciones, según sea el caso para cada tipo de variable (cuantitativas y cualitativas respectivamente) a una confiabilidad del 95%. La presencia o ausencia de asociación y correlación en variables cuantitativas o cualitativas se realizará mediante las pruebas de Ji2 y

Correlación de Pearson o Spermatozoos respectivamente; todo lo anterior a una confiabilidad del 95%.

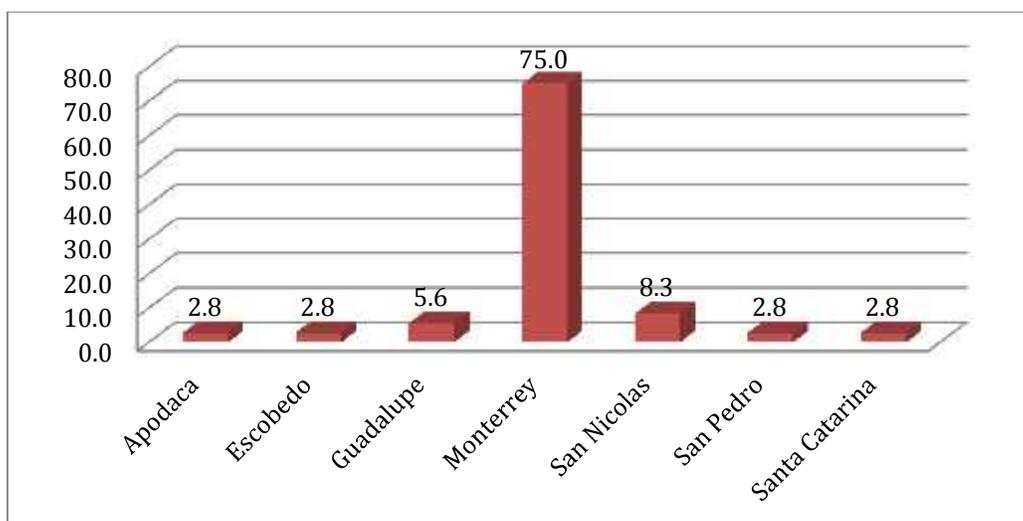
RESULTADOS

Durante el presente estudio, se logró contar con un total de 36 donadores (N) con un total de 2012 muestras (N) analizadas pre y post congelación. A continuación en la tabla 1, se muestran los datos demográficos (Edad, peso, talla, índice de masa corporal, el número de hijos, la cantidad de cigarrros que fuman al día y la fragmentación de DNA del espermograma basal) de los 36 donadores.

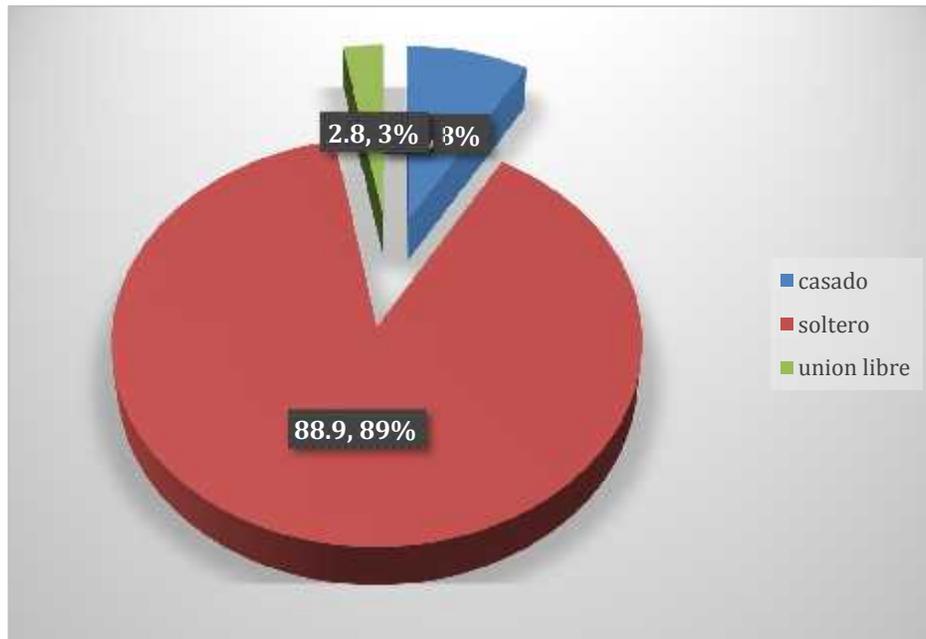
Tabla 1

	Edad	Peso	Talla	IMC	Hijos	Cantidad (día)	Fragmentación DNA
N	36	36	36	36	4	8	30
Media	23.03	78.083	1.7756	24.6765	1.75	3.25	7.733
Mediana	23.00	75.000	1.7500	23.6292	2.00	3.00	7.000
Moda	23 ^a	70,0 ^a	1.72	23,39 ^a	2	2 ^a	6,0 ^a
Desviación estándar	2.236	13.202	.07109	3.08473	.500	1.832	2.3332
Asimetría	-.118	1.720	.536	1.550	-2.00	1.184	.450

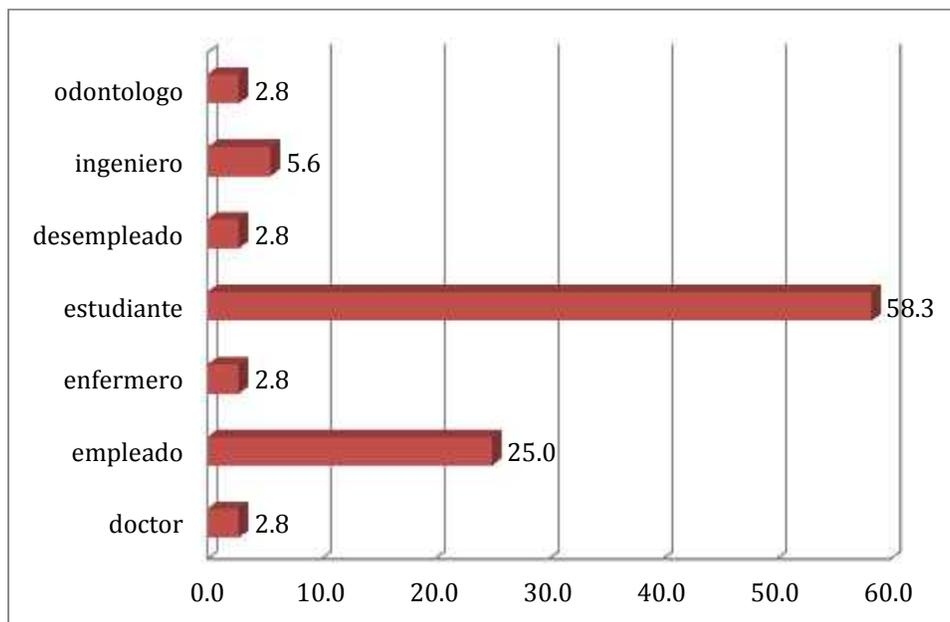
Lugar de nacimiento



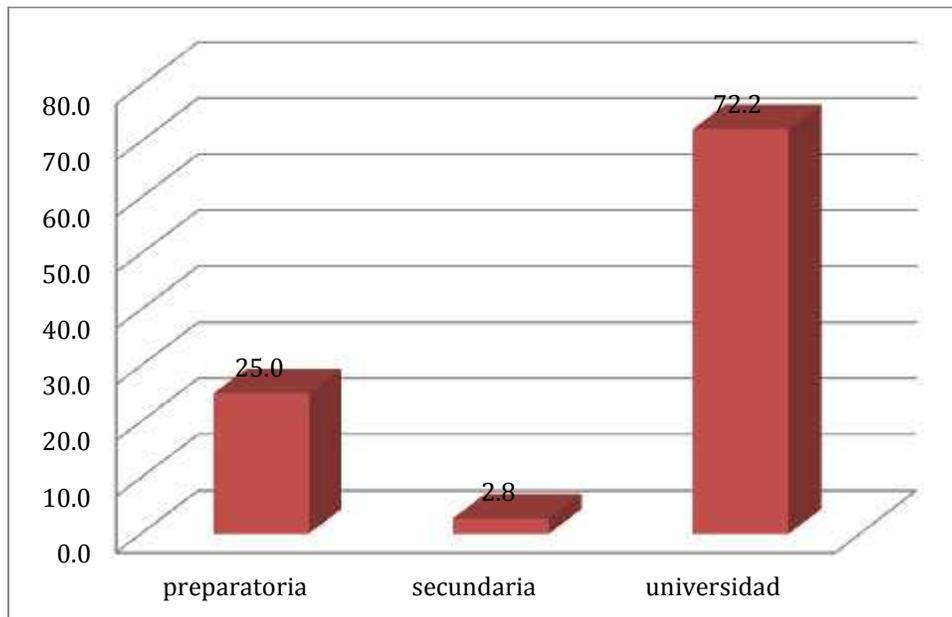
Estado Civil



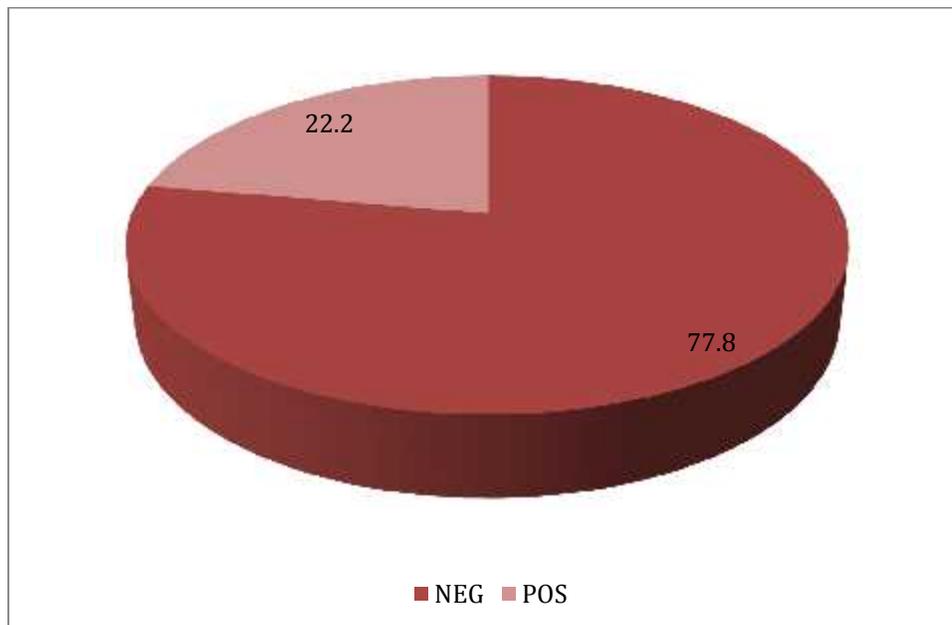
Ocupación



Escolaridad

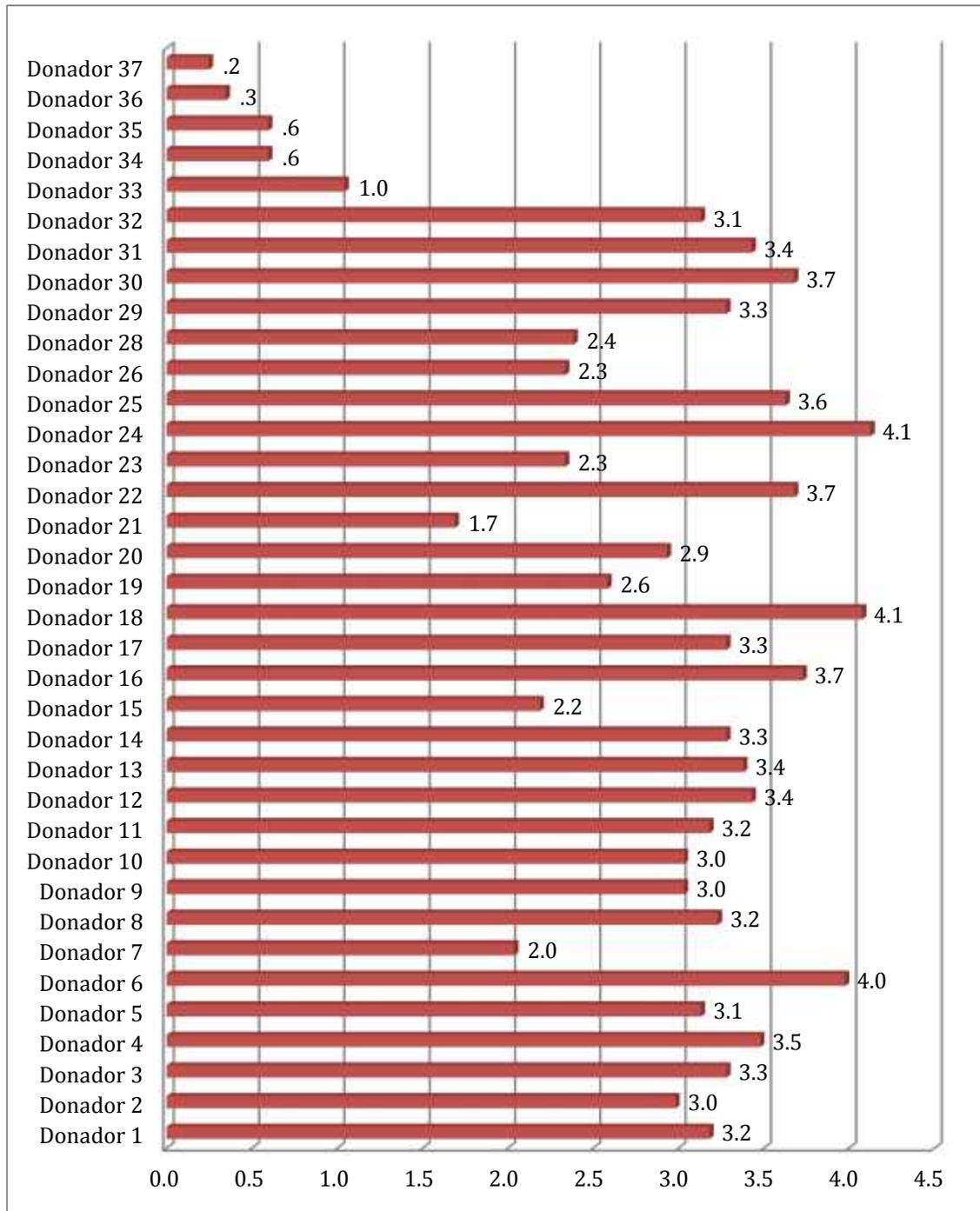


Tabaquismo



En la siguiente tabla (Tabla 2), se grafica el porcentaje del total de muestras que corresponden a cada uno de los 36 donadores.

Tabla 2



A continuación en la tabla 3, se muestran los siguientes resultados (número de viales, concentración de espermias pre congelación en millones/mililitro, porcentaje de movilidad pre congelación, cuenta total motil pre congelación, concentración de espermias post congelación en millones/mililitro, porcentaje de movilidad pos

congelación, y por último cuenta total motil post congelación) del total de las muestras entregadas de los 36 donadores. (N2012)

Tabla 3

N= 2012	#	PRE	PRE	PRE	POST	POST	POST
	VIALES	CONC (Mill/ml)	MOV. (%)	CTM	CONC (Mill/ml)	MOV. (%)	CTM
N	1935	2011	2011	2010	1494	1500	1490
Media	1.54	88.95	49.69	45.46	49.75	49.78	25.08
Mediana	1.00	80.00	50.00	38.25	47.00	50.00	23.93
Moda	1.00	50.00	50.00	36.00	40.00	50.00	24.00
Desviación estándar	0.74	51.98	8.93	30.29	21.36	13.44	12.55
Asimetría	1.68	2.12	0.56	2.16	1.15	-0.52	0.80

T de Student

	Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar	P
PRE CONC (Mill/ml)	90.77	1494	55.04	1.42	.000
POST CONC (Mill/ml)	<u>49.75</u>	1494	21.36	0.55	
PRE MOV. (%)	51.83	1500	8.44	0.22	.000
POST MOV. (%)	<u>49.78</u>	1500	13.44	0.35	
PRE CTM	48.33	1490	32.37	0.84	.000
POST CTM	<u>25.08</u>	1490	12.55	0.33	

Lo rojo es estadísticamente significativo
mediante la prueba de T de Student a un 95% de confianza
en negrita lo que es estadísticamente superior a lo subrayado

A continuación (tabla 4) se muestran todas las muestras recogidas de un primer grupo donde se encontraban los donadores con una cuenta total motil normal (CTMN) por debajo de 40 millones en el espermograma basal, se analizaron los

siguientes resultados (concentración de espermatozoides pre congelación en millones/mililitro, porcentaje de movilidad pre congelación, cuenta total motil pre congelación, concentración de espermatozoides post congelación en millones/mililitro, porcentaje de movilidad post congelación, y por último cuenta total motil post congelación).



Tabla 4. Grupo con CTMN 40 millones en el espermograma basal

	Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar	P
PRE CONC (Mill/ml)	88.80	595.00	56.55	2.32	0.000
POST CONC (Mill/ml)	48.54	595.00	22.07	0.90	
PRE MOV. (%)	49.66	597.00	8.03	0.33	0.000
POST MOV. (%)	46.98	597.00	14.63	0.60	
PRE CTM	45.77	592.00	32.39	1.33	0.000
POST CTM	23.21	592.00	12.79	0.53	

Lo rojo es estadísticamente significativo mediante la prueba de T de Student a un 95% de confianza

A continuación (tabla 5) se muestran todas las muestras recogidas de un segundo grupo donde se encontraban los donadores con una cuenta total motil normal (CTMN) por arriba de 40 millones en el espermograma basal, se analizaron los siguientes resultados (concentración de espermatozoides pre congelación en

millones/mililitro, porcentaje de movilidad pre congelación, cuenta total motil pre congelación, concentración de espermatozoides post congelación en millones/mililitro, porcentaje de movilidad post congelación, y por último cuenta total motil post congelación).



Tabla 5. Grupo con CTMN 40 millones en el espermograma basal

	Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar	P
PRE CONC (Mill/ml)	92.08	899.00	54.01	1.80	0.000
POST CONC (Mill/ml)	50.55	899.00	20.85	0.70	
PRE MOV. (%)	53.27	903.00	8.40	0.28	0.000
POST MOV. (%)	51.62	903.00	12.26	0.41	
PRE CTM	50.01	898.00	32.27	1.08	0.000
POST CTM	26.32	898.00	12.24	0.41	

Lo rojo es estadísticamente significativo mediante la prueba de T de Student a un 95% de confianza

A continuación (tabla 6) se muestran todas las muestras recogidas de un tercer grupo donde se encontraban los donadores con una cuenta total motil normal (CTMN) post prueba de descongelación por debajo de 7.5 millones x ml. en el espermograma basal, se analizaron los siguientes resultados (concentración de espermatozoides pre congelación en millones/mililitro, porcentaje de movilidad pre congelación, cuenta total motil pre congelación, concentración de espermatozoides post

congelación en millones/mililitro, porcentaje de movilidad pos congelación, y por último cuenta total motil post congelación).

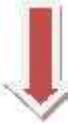


Tabla 6. Grupo con CTMN 7.5 millones x ml prueba de descongelación

	Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar	P
PRE CONC (Mill/ml)	83.57	625.00	43.06	1.72	0.000
POST CONC (Mill/ml)	48.71	625.00	21.95	0.88	
PRE MOV. (%)	50.21	629.00	9.31	0.37	0.000
POST MOV. (%)	46.79	629.00	14.78	0.59	
PRE CTM	43.28	622.00	25.18	1.01	0.000
POST CTM	23.40	622.00	12.89	0.52	

Lo rojo es estadísticamente significativo mediante la prueba de T de Student a un 95% de confianza

A continuación (tabla 7) se muestran todas las muestras recogidas de un cuarto grupo donde se encontraban los donadores con una cuenta total motil normal (CTMN) post prueba de descongelación por arriba de 7.5 millones x ml. en el espermograma basal, se analizaron los siguientes resultados (concentración de espermatozoides pre congelación en millones/mililitro, porcentaje de movilidad pre congelación, cuenta total motil pre congelación, concentración de espermatozoides post

congelación en millones/mililitro, porcentaje de movilidad pos congelación, y por último cuenta total motil post congelación).



Tabla 7. Grupo con CTMN 7.5 millones x ml prueba de descongelación

	Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar	P
PRE CONC (Mill/ml)	95.95	869.00	61.75	2.09	0.000
POST CONC (Mill/ml)	50.49	869.00	20.90	0.71	
PRE MOV. (%)	53.01	871.00	7.54	0.26	0.000
POST MOV. (%)	51.93	871.00	11.94	0.40	
PRE CTM	51.94	868.00	36.26	1.23	0.000
POST CTM	26.29	868.00	12.17	0.41	

Lo rojo es estadísticamente significativo mediante la prueba de T de Student a un 95% de confianza

A continuación (tabla 8) se muestran los cuatro grupos con sus respectivos números de muestras comparando la concentración de espermatozoides pre congelación en millones/mililitro, porcentaje de movilidad pre congelación, cuenta total motil pre congelación, concentración de espermatozoides post congelación en millones/mililitro, porcentaje de movilidad pos congelación, y por último cuenta total motil post congelación, en la última columna se muestra el porcentaje que se pierde entre la pre y la post congelación en cada uno de los grupos.

Tabla 8

	Grupo 1 (<40 mill) N=595	Grupo 2 (<40 mill) N=899	Grupo 3 (<7.5 mill) N=625	Grupo 4 (>7.5 mill) N=869	% que se pierde entre pre y post en cada grupo
PRE CONC (Mill/ml)	95.95	92.08	83.57	95.95	1(48), 2(46)
POST CONC (Mill/ml)	50.49	50.55	48.71	50.49	3(43), 4(48)
PRE MOV. (%)	53.01	53.27	50.21	53.01	1(6), 2(6)
POST MOV. (%)	51.93	51.62	46.79	51.93	3(8), 4(6)
PRE CTM	51.94	50.01	43.28	51.94	1(49), 2(48)
POST CTM	26.29	26.32	23.40	26.29	3(47), 4(49)

Por último (tabla 9) se muestra el nuevo valor que proponemos en la CTM (38.88 millones de espermias) pre congelación x ml. para poder asegurar un mínimo de 20 millones de espermias en la CTM post congelación. Estos resultados son en 1 ml. (1 vial)

Si la muestra total pre congelación tiene más de un ml. se debe de multiplicar esta cantidad (38.88 millones) x el número de viales que deseamos obtener (Ejemplo: para congelar 2 viales necesitamos una CTM pre congelación de 77.76 millones en la muestra total pre congelación)

Tabla 9

Cuenta Total Motil Pre congelación	38.88 millones x ml.
Cuenta Total Motil Pos congelación	20.00 millones x ml.

DISCUSIÓN

La criopreservación de semen ha sido durante mucho tiempo una herramienta importante para preservación de la fertilidad masculina mediante el uso de TRA. Hoy en día este método es ampliamente utilizado por muchas razones, entre ellas destacan: La conservación antes de la quimioterapia citotóxica, la radioterapia o ciertos tratamientos quirúrgicos que pueden conducir a insuficiencia testicular o disfunción eyaculatoria, para el almacenamiento del semen de donante, y el almacenamiento de los espermatozoides recuperados de pacientes con azoospermia que han sido sometidos a cualquiera de las diferentes técnicas de

recuperación espermática ya sea del testículo o del epidídimo, etc. ⁽²⁶⁾

Durante el proceso de la criopreservación, los efectos osmóticos de congelación y descongelación reducen además de la concentración, la capacidad de fertilización de los espermatozoides al sufrir daño en las membranas celulares, la motilidad espermática, daños al acrosoma, y todo esto finalmente afectan la integridad estructural y funcional del esperma. ⁽²⁷⁾

En un estudio publicado por Punyatanasakchai, se encontró diferencias estadísticamente significativas en las muestras pre y post-congelamiento en la motilidad, sin encontrar diferencias post-congelamiento en el porcentaje de formas normales según criterios de Kruger. ⁽²⁸⁾

En nuestro estudio se encontró que al contrastar los promedios mediante la prueba de T de Student a una confiabilidad del 95%, se observó diferencia estadísticamente significativa, en los siguientes parámetros seminales: Concentración de espermatozoides pre congelación en millones/mililitro 90.77 vs 49.75 post congelación respectivamente (al 95% IC, $p=0.000$), porcentaje de movilidad pre congelación 51.83% vs 49.78% post congelación respectivamente (al 95% IC, $p=0.000$), cuenta total motil pre congelación 48.33 vs 25.08 post congelación respectivamente (al 95% IC, $p=0.000$)

Aún no existe un criterio estrictamente definido para todos los bancos de semen, como se demuestra en el artículo publicado por Douglas T. Carrel de la escuela de medicina de la Universidad de Utah ⁽¹⁰⁾, en el cual se evaluó la calidad del semen de donadores de siete bancos de espermatozoides comerciales. Los resultados que arrojó, fueron los siguientes: se observó una gran variabilidad entre los bancos, con respecto al porcentaje de motilidad progresiva (rango de 8.8 ± 5.8 a 42.4 ± 5.5) y la morfología en base al criterio estricto de Kruger (rango de 10.1 ± 3.3 a 26.6 ± 4.7); concluyendo entonces que existe una variabilidad en la calidad del semen de donadores, ya sea entre bancos o en los donadores de un mismo banco;

demostrando la falta de uniformidad en los criterios usados para la selección de donadores potenciales.

En el presente estudio se proponen 2 nuevos criterios de inclusión para evaluar a los candidatos a donadores de semen en el centro de fertilidad IECH con el espermograma basal y de este modo tratar de predecir el comportamiento de las muestras de los donadores (no basarnos solo en los criterios establecidos por la OMS para la selección de un donador) y de este modo evitar esta variabilidad anteriormente mencionada.

El primer criterio que utilizamos para formar los grupos fue la cuenta total motil normal (CTMN) del espermograma basal, el primer grupo (debajo de 40 millones) y el segundo grupo (arriba de 40 millones) de espermogramas obteniendo los siguientes resultados: Concentración de espermogramas pre congelación en millones/mililitro de (88.80 bajo vs 92.08 alto), porcentaje de movilidad pre congelación de (49% bajo vs 53% alto), cuenta total motil pre congelación de (45.77 bajo vs 50.01 alto), concentración de espermogramas post congelación en millones/mililitro de (48.54 bajo vs 50.55 alto), porcentaje de movilidad post congelación de (46.98% bajo vs 51.62% alto), y por último cuenta total motil post congelación de (23.21 bajo vs 26.32 alto) respectivamente. Como observamos todos los valores son superiores en las seis variables en el que el grupo donde el espermograma de tamizaje tenían arriba de 40 millones de CTMN en la muestra basal.

El segundo criterio que utilizamos para formar los grupos fue la cuenta total motil normal (CTMN) x ml. en la prueba de descongelación del espermograma basal, el primer grupo (debajo de 7.5 millones x ml.) y el segundo grupo (arriba de 7.5 millones x ml.) de espermogramas obteniendo los siguientes resultados: Concentración de espermogramas pre congelación en millones/mililitro de (83.57 bajo vs 95.95 alto), porcentaje de movilidad pre congelación de (50.21 bajo % vs 53.01 % alto), cuenta total motil pre congelación de (43.28 bajo vs 51.94 alto), concentración de espermogramas post congelación en millones/mililitro de (48.71 bajo vs 50.49 alto), porcentaje de

movilidad pos congelación de (46.79% bajo vs 51.93% alto), y por último cuenta total motil post congelación de (23.40 bajo vs 26.29 alto) respectivamente. Como observamos todos los valores son superiores en las seis variables que analizamos en el grupo donde el espermograma de tamizaje tenían arriba de 7.5 millones x ml. de CTMN en la prueba de descongelación.

Aunque como mencionamos anteriormente en los dos grupos superiores todos los valores fueron superiores (grupo 2 y grupo 4) en las seis variables que analizamos, sin embargo al momento de sacar el porcentaje en la cuenta, movilidad, y CTM que decencia entre la pre y post congelación, este porcentaje permaneció constante entre cada uno de los 4 grupos; Cuenta: grupo 1 (48%), grupo 2 (46%), grupo 3 (43%), y grupo 4 (48%). Motilidad: grupo 1 (6%), grupo 2 (6%), grupo 3 (8%), y grupo 4 (6%). CTM: grupo 1 (49%), grupo 2 (48%), grupo 3 (47%), y grupo 4 (49%) respectivamente. Dicho en otras palabras la congelación de esperma afecta por igual a los cuatro grupos. Las muestras que tienen más células pre congelación pierden más células, y la muestras que tienen menos lógicamente pierden menos, sin embargo el porcentaje de pérdida en todas las muestras permanece constante, y no importa el valor ni las características que las muestras tengan en la pre congelación.

Los resultados del presente estudio fueron hechos en donadores sanos, en contraste con el artículo publicado en el 2013 por Selene Degl Innocenti en el departamento de andrología de la Universidad de Florencia titulado “Predicción de los resultados post descongelación utilizando la calidad en el espermograma basal para la crio preservación de semen en pacientes con oligospermia, cáncer, y otras patologías”⁽³⁰⁾, donde el objetivo de este estudio era tratar de predecir como el espermograma basal pronosticaba la recuperación de espermias después de la descongelación, este artículo como lo mencionábamos anteriormente fue hecho en pacientes que tenían alguna patología y no en donadores sanos. Las conclusiones de este estudio fueron que independientemente de la razón por la que la criopreservación se requería, si uno de los parámetros del semen basal caía por

debajo del quinto percentil de los valores de referencia de la Organización Mundial de la Salud, la recuperación de espermatozoides móviles y viables después de la descongelación era baja, también concluyo que el análisis basal del semen podía predecir la recuperación de la tasa de espermatozoides móviles después de la descongelación con una alta precisión, sensibilidad y especificidad. Usando esta información el medico podría realizar un asesoramiento adecuado sobre las posibilidades futuras de fecundidad para el paciente.

Después de que algún donador es aceptado, el valor límite que se tiene actualmente en el banco de semen del centro de fertilidad IECH para poder congelar la muestra es arriba de 30 millones de espermias móviles (CTM) pre congelación en el total de la muestra. En el presente estudio se analizaron más de dos mil muestras congeladas provenientes de 36 diferentes donadores, después de realizar el análisis de cada una de estas muestras, el nuevo valor que se propone en este estudio es arriba de 38.88 millones de espermias en la CTM pre congelación x ml. (vial), para que de este modo aseguremos un mínimo de 20 millones de espermias en la cuenta total motil (CTM) x vial una vez que descongelemos la muestra.

CONCLUSIÓN

Se ha demostrado el impacto negativo que tiene la crio preservación en la cuenta y la motilidad del semen. Esta es un área de oportunidad en la que, como hemos observado con el paso del tiempo, hemos tenido avances significativos en las técnicas de congelación, sin embargo todavía encontramos una área de oportunidad donde esperamos mejorar más las técnicas de crio preservación, con el objetivo de que en algunos años se pierda una mínima cantidad de células al momento de realizar la crio preservación de los espermatozoides.

Actualmente existe también una falta de uniformidad en los criterios usados para la selección de donadores potenciales en los bancos de semen, por lo tanto existe una gran variabilidad en la calidad del semen de donadores de los diferentes bancos, así como del mismo banco. Por este motivo, este estudio trata de introducir nuevos criterios de selección de los donadores, con el objetivo que estos nuevos criterios puedan predecir mediante el espermograma basal y la prueba de descongelación, cómo será el comportamiento en la calidad de las muestras a lo largo del todo el

proceso que atraviesan los donadores, y de esta manera tratar de reducir la variabilidad que actualmente existe.

Proponemos utilizar nuevos criterios para la selección de los donadores como lo son la cuenta total motil normal arriba de 40 millones en el espermograma basal y la cuenta total motil normal arriba de 7.5 millones de espermatozoides x ml en la prueba de descongelación como nuevos criterios de selección para los candidatos a ser donadores del banco de semen en el centro de fertilidad IECH, ya que como lo demostró el presente estudio el utilizar estos valores de cohorte predice una mejor calidad en las futuras muestras de los donadores

En el presente estudio se analizaron más de dos mil muestras congeladas provenientes de 36 diferentes donadores de la zona metropolitana de Monterrey, esto nos permitió observar las fluctuaciones en el comportamiento de las muestras en base a nuestra población de estudio y después de realizar el análisis de cada una de ellas, podemos concluir que una vez que los donadores son seccionados con los nuevos criterios que se proponen en este estudio (anteriormente mencionados), sugerimos también un nuevo valor de cohorte para aceptar la muestra de algún donador antes de congelarla (38.88 millones de espermias móviles en la CTM pre congelación), todo esto con el objetivo de que después de descongelar la muestra y que esta sufra todo el proceso de cambios en la cuenta y la motilidad antes mencionados, nos permita a nosotros asegurar una muestra post congelación donde obtengamos como mínimo 20 millones de espermias en la cuenta total motil (CTM) x vial, lo que es el producto final que sale a la venta en el banco de semen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Larson JM, McKinney KA, Mixon BA, Burry KA, Wolf DP. An IUI ready cryopreservation method compared with sperm recovery after conational 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 - Velázquez C. G, Fisiología de la reproducción humana, Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción 2009;1(4):115-30.
- 5 - Agarwal A. y Allamaneni S., Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina Rev Int Androl. 2005;3(1):0-0
- 6 - Teppa G, A. D. y Palacios T. A. Evaluación actual de la infertilidad masculina. Invest. clín, dic. 2004, vol.45, no.4, p.355-370. ISSN 0535-5133.
- 7 - Colin A., Barroso G., Gomez N., Hakan D. E., and Oehninger S., The effect of age on the expression of apoptosis biomarkers in human spermatozoa Fertility and Sterility Vol. 94, No. 7, December 2010.

8 - Chemes HE y Rawe VYR Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. Hum. Reprod. Update, 5:, 2003;405-428.

9 - Bestard Camps, Joan y otros, Parentesco y reproducción asistida: cuerpo persona y relaciones, Barcelona, Universidad de Barcelona, 2003.

10 - Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate. Human Reprod 1998; 13:3384-3389.

11 - Food and Drug Administration. Guidance for industry: eligibility determination for donors of human cells, tissues, and cellular and tissue-based products (HCT/Ps). Available at <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>. August 2007.

12 - World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction. 5th. ed. New York, Cambridge University Press, 2010.

13 - Practice committee of the American Society for Reproductive Medicine. Recommendations for gamete and embryo donation: a committee opinion. Fertil and Steril. 90, 30-44, 2012.

14 - Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology 2004;48:146-56.

15 - Mazur P Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol 1984,247:C125-42.

16 - Seidel GE Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. Therioqenology

17 - Mathews K.M, van Holde KE, Ahern KG. Biochemistry Third edition. Addison Wesley; 2003 p. 363-92.

18 - Mendoza JA, Dulin P, Warren T. The lower hydrolysis of ATP by the stress protein GroEL is a major factor responsible for the diminished chaperonin activity at low temperature. Cryobiology 2000;41:319-23.

19 - Meryman HT. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. Cryobiology 1971;8:489-500.

20 - Polge CA, Smith AV, Parkes AS. Revival the spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. Nature 1949;164:666.

21 - Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Critser JK. Determination of optimal cryoprotectans and procedures for their addition and removal for human spermatozoa. Hum Reprod 1997;12:112-8.

22 - Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. J Exp Zool 1993;19:432-7.

23 - Mclaughlin E, Ford WC, Hull MG. A comparison of the freezing of human semen in the uncirculated vapour about liquid nitrogen and in a commercial semi-programmable freezer. Hum Reprod 1990;5:724-8.

24 - Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eighth-cell embryo. Nature 1983;305:707-9.

25 - Manual de laboratorio de la OMS para examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. 4a ed. Madrid, Spain: Panamericana; 1999: 74.

26 - Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants Kiran P. Nallella, M.D.,^a Rakesh K. Sharma, Ph.D.,^a Shyam S. R., Ph.D., H.C.L.D. 2013

27 - Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-Y staining Ming-Huei Lin, M.D., Mahmood Morshedi, M.D. 1999

28 - Comparison of cryopreserved human sperm in vapor and liquid phases of liquid nitrogen: effect on motility parameters, morphology, and sperm function Piyaphan Punyatanasakchai, M.D.,^a Areephan Sophonsritsuk, M.D. 2008.

29 - Effect of liquid nitrogen vapor storage on the motility, viability, morphology, deoxyribonucleic acid integrity, and mitochondrial potential of frozen-thawed human spermatozoa Jung Jin Lim, Ph.D. 2010

30 - Semen cryopreservation for men banking for oligospermia, cancers, and other pathologies: prediction of post-thaw outcome using basal semen quality Selene Degl'Innocenti, M.L.T.,^a Erminio Filimberti, Ph.D.,^a Angela Magini, M.D. 2014.