

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
en
Biología y Tecnología Aplicada a la
Reproducción Humana Asistida

**ÉXITO REPRODUCTIVO DE LOS
TRATAMIENTOS DE FECUNDACIÓN IN
VITRO CON SEMEN CONGELADO**

Autor: Melissa García Elizondo

Tutor: Juan Carlos Martínez Soto

Alcobendas, Septiembre 2023

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	5
MATERIALES Y MÉTODOS	6
RESULTADOS	6
DISCUSIÓN	11
CONCLUSIONES	15
BIBLIOGRAFÍA	15

RESUMEN

Por diferentes motivos el uso del semen congelado ha ido aumentando, cada vez más se van modificando o implementado nuevos protocolos para aumentar la efectividad del proceso de congelación-descongelación. Uno de los objetivos principales a mejorar en este proceso es disminuir la magnitud en los daños estructurales y moleculares de los espermatozoides. La criopreservación provoca una reducción en la motilidad y vitalidad espermática debido principalmente a cambios osmóticos y lesiones causadas por los cambios drásticos de temperatura. Todavía existen muchos mecanismos que aún no han sido estudiados a profundidad y que pudiera tener cierta repercusión en las tasas de implantación, tasas de recién nacidos vivos, tasas de fecundación, etcétera.

En los resultados obtenidos de los estudios de Borger, De Croo y Kuczynski se observaron mejores tasas de fecundación, implantación, embarazos en curso y recién nacidos vivos utilizando muestras frescas en lugar de muestras congeladas. Huang evidenció que los diferentes periodos de almacenamiento no influían en la tasa de éxito reproductivo. Mohamed estableció que no había una distinción importante entre utilizar la congelación lenta y la vitrificación ya que las tasas de motilidad progresiva, vitalidad y potencial de membrana mitocondrial eran parecidas. Por otra parte, Aizpurua reportó que la vitrificación libre de crioprotectores permeables daba mejores resultados en la motilidad, morfología, vitalidad y fragmentación de ADN comparado con la congelación convencional.

El proceso de congelación-descongelación espermática es una herramienta con múltiples ventajas que brinda la posibilidad de tener un recién nacido vivo en casa. A pesar de ser un procedimiento realizado de manera rutinaria en las TRAs faltan muchos estudios para optimizar el protocolo, reducir el daño estructural a nivel celular y a nivel del ADN y aumentar el éxito reproductivo. Todo esto con la finalidad de que en un futuro las muestras frescas y congeladas presenten una capacidad fecundante similar.

Palabras clave: semen congelado, semen fresco, éxito reproductivo, tasa de fecundación, tasa de recién nacido vivo, capacidad fecundante, congelación lenta, vitrificación.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día se le está dando mayor importancia al papel que cumple el factor masculino en los problemas de infertilidad ya que se ha demostrado en múltiples ocasiones que hay problemas en la calidad seminal en aproximadamente el 50% de los casos de infertilidad. Hay una gran cantidad de marcadores diagnósticos que pueden ser útiles al momento de evaluar la infertilidad masculina, entre muchas se habla del daño al ADN. Este parámetro predictor muchas veces nos puede ser de utilidad para saber qué tan exitoso será el tratamiento reproductivo, ya que además es un indicador fiable de deterioro celular. La principal causa del daño al ADN en el espermatozoide es el estrés oxidativo (Lewis, 2013).

El estrés oxidativo se produce cuando existe un desequilibrio entre la capacidad del sistema antioxidante del espermatozoide para neutralizar las especies reactivas de oxígeno y la producción de éstas mismas. El espermatozoide tiene pocos mecanismos de reparación, por lo que es común encontrar daño en el ADN incluso en muestras con gran calidad seminal como las de los donantes. Se ha observado que el estrés oxidativo puede disminuir la tasa de éxito en los tratamientos de fecundación in vitro (Agarwal, 2014). Lo que es clínicamente relevante es valorar cuál es el grado de daño en el que ya existe un impacto negativo en el resultado final del tratamiento.

La introducción de la criopreservación al campo de la reproducción humana asistida representó un avance significativo hacia la obtención de un mayor número de recién nacidos vivos en casa. La preservación de semen desempeña un papel importante en el manejo de la fertilidad, por lo que su óptima ejecución parece influir en el éxito reproductivo de los tratamientos de FIV.

El proceso de congelación-descongelación ha sufrido muchas modificaciones a lo largo del tiempo. Algunos ejemplos serían la aplicación de la yema de huevo como medio para evitar que la membrana sufra daños debido al shock por frío o la implementación del glicerol como agente crioprotector para evitar lesiones crioaducidas como la formación de hielo intracelular (Fernández et al., 2009).

Actualmente existen dos métodos principales que se utilizan para criopreservar el semen proveniente del humano: la congelación convencional y la vitrificación. La primera también llamada congelación lenta es la técnica más empleada hoy en día, en ésta se reduce gradualmente la temperatura utilizando crioprotectores. Este tipo de criopreservación afecta la calidad seminal a

nivel funcional y estructural debido al efecto de los crioprotectores y la formación de cristales de hielo causando daños osmóticos y tóxicos en el espermatozoide.

La vitrificación cada vez se está utilizando más al ser un procedimiento rápido, simple y económico. El fundamento de esta técnica básicamente es la disminución ultra rápida de la temperatura ya sea con la presencia o ausencia de crioprotectores, lo que ocurre es que se evita la formación de cristales de hielo porque el agua al enfriarse tan rápido adquiere un estado vítreo. En 2019 se reportó el nacimiento de un bebé sano utilizando ICSI con una muestra seminal vitrificada utilizando un nuevo protocolo de vitrificación libre de crioprotectores permeables (Medrano et al., 2019).

Ha sido demostrado por Le y colaboradores que la congelación convencional da como resultado una mayor tasa de movilidad y viabilidad espermática, mientras que existe mejor morfología y menos defectos espermáticos en muestras que han pasado por el método de vitrificación (Le et al., 2019).

La criopreservación presenta la ventaja de que al culminar en una temperatura de -196°C , las reacciones químicas dejan de llevarse a cabo deteniendo por completo el metabolismo celular haciendo posible su almacenamiento por tiempos indefinidos y al mismo tiempo manteniendo la viabilidad y capacidad fecundante. En la parte desfavorable se habla de que podría tener un impacto negativo en la estructura y funcionalidad del espermatozoide a pesar de que éste presenta menor sensibilidad al daño producido por el proceso. Esta propiedad puede derivarse de dos características importantes del espermatozoide: su bajo contenido de agua y su gran fluidez de membrana.

Algunos de los procesos que pudieran dañar al espermatozoide serían el shock térmico con la formación de hielo tanto de forma extracelular como intracelular, la deshidratación celular y el shock osmótico (Di Santo et al., 2012). Siendo la formación de cristales y la generación de ROS las principales causas de daño celular.

Las velocidades de enfriamiento tienen un rol muy importante en el tipo de daño que puede ser causado en la célula. Por ejemplo, si la velocidad de enfriamiento es rápida ocurrirá la formación de hielo intracelular provocando la ruptura de las membranas y afectando la función de las organelas. En cambio, si la velocidad de enfriamiento es lenta la célula se deshidratará haciendo

que la concentración de solutos sea tan elevada que llegue a producir un efecto tóxico en la célula. Cabe recalcar que no solamente ocurren daños en la etapa de la congelación, sino que en la descongelación puede suceder la recrystalización o que los cristales de hielo se derritan (Di Santo et al., 2012).

Es bien conocido que la motilidad y la tasa de fecundación disminuyen en los espermatozoides que presentan alteraciones y que son sometidos a la congelación. De hecho, la tasa de recuperación de la motilidad espermática post-descongelación no es mayor al 60% (Tongdee et al., 2015). Esto debido al simple hecho de que congelar a temperaturas bajo cero causa daños irreversibles en el espermatozoide, principalmente en las membranas, en la estructura acrosómica y en la actividad de la acrosina, una enzima que en pocas cantidades se asocia con la subfertilidad o infertilidad (Kennedy et al., 1989).

Las mitocondrias juegan un papel muy importante en la generación de energía en forma de ATP, lo cual ayuda consecuentemente al movimiento del espermatozoide. Entonces la baja motilidad espermática también puede ser consecuencia de que la estructura y funcionalidad de las mitocondrias puede verse comprometida por el proceso de criopreservación. (Tamburrino et al., 2023). Por estas razones es fundamental tener establecido un buen protocolo de criopreservación para así garantizar la funcionalidad y viabilidad óptima de los espermatozoides al ser sometidos a temperaturas cada vez más bajas por un tiempo prolongado.

A pesar de que el semen congelado se utiliza de forma rutinaria en los tratamientos de FIV, no existe un protocolo universal, único y funcional para el proceso de congelación-descongelación. Una de las principales razones por las que no se ha llegado a un acuerdo en común es porque hay una gran variabilidad entre pacientes y muchas veces existen grandes oscilaciones en el mismo paciente en un determinado periodo de tiempo.

El aumento de demanda de semen donado por parte de la población de madres solteras y la comunidad LGBTQ+ con deseos de gestación han exponenciado la utilización de semen proveniente de donantes. Por lo que muchas técnicas de reproducción asistida, ya sea una inseminación artificial heteróloga (IAD) o una fecundación in vitro (FIV/ICSI), se están llevando a cabo con semen congelado en lugar de semen fresco. Las muestras de donantes se congelan con la finalidad de asegurar que el semen esté libre de agentes infecciosos como el VIH, VHB o HVC.

De ahí la importancia de tener un excelente protocolo de congelación-descongelación que nos asegure una buena tasa de éxito en las técnicas de reproducción asistida (TRAs) utilizando semen congelado.

Por otra parte, la preservación de semen es el único método que se ha comprobado que puede ofrecer la posibilidad de que un sector específico pueda tener hijos en un futuro: pacientes que cursarán algún tratamiento que pueda causar fallo testicular o una disfunción eyaculatoria comprometiendo así su fertilidad, pacientes con problemas al momento de eyacular y pacientes a los cuales se les realizará una biopsia testicular o aspirado de epidídimo. La principal ventaja de tener criopreservado el semen de este tipo de pacientes es que tenemos un stock disponible de espermatozoides que podremos utilizar en un determinado momento ayudando a cumplir su sueño reproductivo (Martínez, 2013).

Una vez que comprendamos todas estas implicaciones que conlleva el proceso de la criopreservación podremos trabajar para reducir el impacto de los daños en la estructura y en la integridad del ADN en el espermatozoide, optimizando los protocolos y aumentando el éxito reproductivo. Es crucial que el resultado final de la congelación-descongelación sea la obtención de una buena tasa de recuperación de espermatozoides funcionalmente competentes, cuya capacidad fecundante no haya sido modificada en el proceso.

OBJETIVOS

- Valorar la tasa de éxito reportada en los tratamientos de Reproducción Asistida utilizando muestras congeladas y muestras frescas basándonos en la literatura.
- Determinar si el periodo de almacenamiento de las muestras criopreservadas influye en el éxito reproductivo.
- Comparar los resultados obtenidos tras utilizar el protocolo de congelación lenta versus el protocolo de vitrificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos multidisciplinarias como Google Académico, Scopus y Web Of Science, y también bases de datos en el ámbito de la salud como Pubmed. Se hizo uso del operador booleano AND para adquirir mayor precisión utilizando descriptores o palabras adecuadas para conseguir resultados de búsqueda en donde ambos términos se encontrarán presentes.

La búsqueda de artículos se realizó en el idioma de inglés entre los años de 1997 al 2023 utilizando las siguientes palabras claves: frozen human semen, fresh human semen, clinical outcome, slow freezing, conventional freezing, vitrification, pregnancy rate, live birth rates, cryostorage of semen. Una vez obtenidos los artículos se hizo una lectura crítica de cada uno de ellos para decidir si aportarían información valiosa una vez incorporados al trabajo de investigación. El artículo científico se incluyó si reportaba al menos uno de estos aspectos: tasa de embarazo, tasa de aborto, tasa de recién nacido vivo, tasa de implantación, tasa de fecundación, porcentaje de motilidad, o porcentaje de vitalidad. Un total de 6 artículos fueron incluidos.

RESULTADOS

Si analizamos el deterioro de la calidad seminal que conlleva el proceso de criopreservación espermática y que podría llegar a explicar una disminución en el éxito de los tratamientos de reproducción asistida podemos analizar diversos estudios.

En el estudio retrospectivo de Huang y colaboradores, donde se analizaba la influencia de un almacenamiento prolongado de muestras criopreservadas de donantes en la motilidad espermática y en el éxito de los tratamientos, no se evidenciaron diferencias significativas en la motilidad espermática durante el proceso de criopreservación en diferentes muestras con distintos tiempos de almacenamientos. Ambos grupos de 6 a 10 años y de 11 a 15 años de almacenamiento se compararon con el grupo de 0.5 a 5 años, obteniéndose en ambos casos una $P = > 0.05$ (Tabla 1). Por otra parte, si se observó una diferencia significativa en cuanto a la tasa de supervivencia entre distintos periodos de almacenamiento. En el mismo estudio se realizaron las mismas comparaciones entre grupos, pero ahora teniendo en cuenta las tasas de nacidos vivos, embarazos y abortos en inseminaciones artificiales con donantes (IAD) y en procedimientos de fecundación

in vitro (FIV). En IAD y en FIV las diferencias respecto al grupo de 0.5 - 5 años no fueron significativas (Tabla 2, 3 y 4).

Long-term cryostorage of semen in a human sperm bank does not affect clinical outcomes

Chuan Huang, Ph.D.,^a Lin Lei, M.S.,^b Hui-Lan Wu, B.S.,^a Run-Xin Gan, M.S.,^a Xiao-Bo Yuan, M.S.,^b Li-Qing Fan, Ph.D.,^{a,b} and Wen-Bing Zhu, Ph.D.^{a,b}

Almacenamiento (años)	Motilidad espermática (%)			Tasa de supervivencia (%)	Valor P
	Pre-descongelación (%)	Post-descongelación (%)	Valor P		
0.5 - 5.0	52.7 ± 2.8	46.78 ± 3.1	---	85.73 ± 8.8	---
6 - 10	53.32 ± 3.6	44.17 ± 4.7	> 0.05	82.1 ± 9.2	< 0.01
11 - 15	55.30 ± 4.6	41.60 ± 5.2	> 0.05	73.98 ± 10.7	< 0.01

Tabla 1. Relación del período de almacenamiento y la motilidad espermática durante la criopreservación.

Long-term cryostorage of semen in a human sperm bank does not affect clinical outcomes

Chuan Huang, Ph.D.,^a Lin Lei, M.S.,^b Hui-Lan Wu, B.S.,^a Run-Xin Gan, M.S.,^a Xiao-Bo Yuan, M.S.,^b Li-Qing Fan, Ph.D.,^{a,b} and Wen-Bing Zhu, Ph.D.^{a,b}

Almacenamiento (años)	Tasa de nacidos vivos (%)			
	IAD	Valor P	FIV	Valor P
0.5 - 5.0	82.7	---	81.63	---
6 - 10	80.21	0.334	79.11	0.124
11 - 15	82.11	0.777	73.91	0.340

Tabla 2. Relación del período de almacenamiento y la tasa de nacidos vivos en IAD y FIV.

Long-term cryostorage of semen in a human sperm bank does not affect clinical outcomes

Chuan Huang, Ph.D.,^a Lin Lei, M.S.,^b Hui-Lan Wu, B.S.,^a Run-Xin Gan, M.S.,^a Xiao-Bo Yuan, M.S.,^b Li-Qing Fan, Ph.D.,^{a,b} and Wen-Bing Zhu, Ph.D.^{a,b}

Almacenamiento (años)	Tasa de embarazos (%)			
	IAD	Valor P	FIV	Valor P
0.5 - 5.0	23.09	---	64.29	---
6 - 10	22.36	0.485	64.94	0.690
11 - 15	22.32	0.845	53.48	0.140

Tabla 3. Relación del período de almacenamiento y la tasa de embarazos en la IAD y FIV.

Long-term cryostorage of semen in a human sperm bank does not affect clinical outcomes

Chuan Huang, Ph.D.,^a Lin Lei, M.S.,^b Hui-Lan Wu, B.S.,^a Run-Xin Gan, M.S.,^a Xiao-Bo Yuan, M.S.,^b Li-Qing Fan, Ph.D.,^{a,b} and Wen-Bing Zhu, Ph.D.^{a,b}

Almacenamiento (años)	Tasa de abortos (%)			
	IAD	Valor P	FIV	Valor P
0.5 - 5.0	10.06	---	12.26	---
6 - 10	10.02	0.808	11.38	0.522
11 - 15	12.00	0.796	17.39	0.555

Tabla 4. Relación del período de almacenamiento y la tasa de abortos en la IAD y FIV.

Por otra parte, en el estudio conducido por De Croo et al. se observaron diferencias significativas entre la utilización de espermatozoides extraídos del testículo (TESE) en fresco y TESE criopreservado. En la tasa de fecundación post-ICSI se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en la tasa de implantación por embrión transferido y en la tasa de nacidos vivos por embrión transferido a favor de la utilización de muestra en fresco (Tabla 5).

Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa

I.De Croo^{1,3}, J.Van der Elst¹, K.Everaert², P.De Sutter¹ and M.Dhont¹

Parámetro	TESE Fresco	TESE Congelado	Valor P
Tasa de fecundación después del ICSI (%)	79.3	71.1	≤ 0.008
Tasa de implantación por embrión transferido (%)	24.6	9.1	0.001
Tasa de nacidos vivos por embrión transferido (%)	18.8	7.9	0.043

Tabla 5. Tasa de fecundación, implantación y recién nacidos vivos en TESE fresco vs. TESE congelado.

Los resultados de la investigación de Borger y colaboradores acerca del éxito reproductivo después de microinyectar espermatozoides provenientes de muestras frescas y congeladas de hombres con diferentes diagnóstico se observan en la tabla 6, Se encuentra una diferencia significativa en la tasa de fecundación cuando se microinyectaron las muestras en fresco en comparación con las congeladas en pacientes asteno y oligoastenozoospermicos.

Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa

Edson Borges Jr., M.D., Ph.D.,^a Lia Mara Rossi, Ms.C.,^a Christiany Victor Locambo de Freitas, Ms.C.,^a Patrícia Guilherme, Ms.C.,^a Tatiana Carvalho S. Bonetti, Ms.C.,^a Assumpto Iaconelli, M.D.,^a and Fabio Firmbach Pasqualotto, M.D., Ph.D.,^{a,b}

Parámetros		Tasas		
		Fecundación	Implantación	Embarazo
Normozoospermia	Fresco (%)	74.9	16.3	39.3
	Criopreservado (%)	79.6	16	25
	Valor P	0.284	0.977	0.484
Oligozoospermia	Fresco (%)	73.5	26.6	60
	Criopreservado (%)	73.6	25.9	50
	Valor P	0.991	0.964	0.714
Astenozoospermia	Fresco (%)	75.3	12.5	60
	Criopreservado (%)	50.5	15.5	50
	Valor P	0.001	0.702	0.741
Oligoastenozoospermia	Fresco (%)	72.7	15.1	45
	Criopreservado (%)	57.9	13.5	45.5
	Valor P	0.004	0.702	0.741

Tabla 6. Tasas de fecundación, implantación y embarazo en muestras con diferentes patologías.

Kuczynski et al. reportó una diferencia estadísticamente significativa en los embarazos en curso provenientes del grupo A (se realizó el ICSI con muestra en fresco) y grupo B (se utilizó muestra congelada para hacer el ICSI) (Tabla 7).

The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa—a prospective randomized study

W.Kuczyński^{1,2,5}, M.Dhont³, C.Grygoruk^{1,2}, D.Grochowski⁴, S.Wolczyński⁴ and M.Szamatowicz¹

Parámetro	En fresco	Congelada	Valor P
Embarazos clínicos por ciclo (%)	29.7	38.5	> 0.05
Embarazos en progreso (%)	23.7	35.2	< 0.05
Tasa de implantación (%)	18.9	26.0	> 0.05

Tabla 7. Embarazos clínicos, en progreso y tasa de implantación en muestras en fresco y congeladas.

Los resultados de Aizpurua et al. revelan una serie de hallazgos significativos sobre la eficacia del protocolo de vitrificación espermática libre de crioprotectores permeables en contraste con la congelación lenta utilizada de forma convencional. En la tabla 8 se pueden observar los parámetros más comunes que evalúan la calidad espermática en donde se vieron diferencias significativas a favor de la vitrificación y la congelación lenta en diferentes parámetros seminales.

New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm

J. Aizpurua^{1,2}, L. Medrano^{1,2,8}, M. Enciso³, J. Sarasa³, A. Romero⁴, M.A. Fernández¹, and M.J. Gómez-Torres^{2,4}

Parámetro	Congelación lenta	Vitrificación	Valor P
Motilidad progresiva (%)	11.33 ± 2.70	18.17 ± 2.70	< 0.05
Morfología normal (%)	16.35 ± 1.77	22.24 ± 1.14	< 0.05
Daño en flagelo (%)	51.62 ± 3.38	36.88 ± 3.11	< 0.05
Vitalidad (%)	55.13 ± 4.79	76.38 ± 1.53	< 0.05
Fragmentación del ADN (%)	27.43	20.04	< 0.05
Espermatozoides con acrosoma reaccionado (%)	58.19	44.27	< 0.05

Tabla 8. Influencia de la criopreservación en diferentes parámetros seminales.

Mohamed y su equipo de trabajo no encontraron ninguna reducción significativa de diferentes parámetros seminales entre las muestras congeladas por protocolo tradicional vs las vitrificadas (Tabla 9).

Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study

Mohamed Shehata Ali Mohamed, M.B.B.Ch., M.Sc., M.D.

Parámetro	Congelación lenta	Vitrificación	Valor P
Vitalidad (%)	32.31 ± 7.91	35.88 ± 10.63	> 0.05
Motilidad progresiva (%)	36.31 ± 5.30	39.69 ± 5.61	> 0.05
Alto PMM* (%)	53.25 ± 9.77	58.44 ± 11.93	> 0.05
Bajo PMM* (%)	32.44 ± 6.54	26.81 ± 9.49	> 0.05

***PMM: Potencial de membrana mitocondrial**

Tabla 9. Efecto de la congelación lenta vs. vitrificación

DISCUSIÓN

Sigue en debate el hecho de si ocurre algún tipo de daño en la integridad del ADN después del proceso de congelación-descongelación. Se habla de que podría existir algún riesgo de que el núcleo del espermatozoide sufra una descondensación después de microinyectarlo en el ovocito dando como resultado una tasa más baja de fecundación. Según los resultados de sus investigaciones algunos autores defienden que el proceso efectivamente induce daño en el ADN espermático (de Paula et al., 2006), mientras que otros argumentan que la integridad del ADN no se ve comprometida (Isachenko et al., 2004).

Existe una línea de pensamiento intermedia que señala que el proceso sólo causará daño si se encuentran presentes ciertas condiciones. La hipótesis es que el semen de hombres fértiles es mucho más resistente al daño causado por la criopreservación que el de hombres infértiles, esto teniendo en cuenta los parámetros establecidos por la OMS (Di Santo et al., 2012). Borger et al. apoyan la postura de que no existe diferencia significativa clínicamente entre utilizar

espermatozoides frescos o criopreservados, al menos en muestras normozoospermicas y oligozoospermicas, pero en muestras astenozoospermicas y oligoastenozoospermicas si visualizaron tasas de fecundación mayores utilizando muestras frescas. Las tasas de implantación y embarazo fueron bastante similares entre los dos grupos de pacientes con estas patologías. Esto apoya la suposición de que el semen con parámetros anormales es más susceptible al daño causado por el proceso de congelación-descongelación.

La criopreservación por largos periodos de tiempo de espermatozoides obtenidos directamente del eyaculado parece no tener impacto en los resultados clínicos ya que en los resultados de Huang et al. se observaron tasas de recién nacidos vivos similares en muestras que tenían menos de 5 años almacenadas que muestras que ya llevaban 15 años congeladas. Lo anterior confirma el nivel de eficacia que presenta la criopreservación. No obstante, se ha observado un cierto efecto negativo en la calidad del semen que ha pasado por este proceso de congelación-descongelación, pero no llega a ser estadísticamente significativo.

De Croo y colaboradores establecen que las tasas de implantación, de recién nacidos vivos y de fecundación post-ICSI son significativamente menores utilizando espermatozoides criopreservados provenientes del testículo en comparación con espermatozoides frescos también provenientes del testículo (De Croo et al., 1998). Un punto que es importante recalcar es que aún utilizando espermatozoides que han sido criopreservados es posible alcanzar tasas de fecundación post-ICSI altas, sin embargo, éstas serán significativamente menores que las que se obtendrían utilizando espermatozoides en fresco. También se menciona que los resultados obtenidos difieren dependiendo del origen de los espermatozoides, ya sea del testículo, epidídimo o del eyaculado.

Resultan sumamente interesantes los resultados reportados por Kuczyński y colegas donde se observaron valores de embarazos evolutivos o en progreso significativamente mayores cuando se utilizaba ICSI con espermatozoides descongelados. Se cuestiona si el proceso de congelación-descongelación ayuda en cierta medida a seleccionar de forma indirecta los espermatozoides con mayor capacidad fecundante, ofreciendo así mejores resultados reproductivos (Kuczyński et al., 2001). También se expone que la criopreservación genera ciertos cambios parecidos a los que existen en una capacitación fisiológicamente natural produciendo una activación ovocitaria y formación de pronúcleos más eficiente (Gamzu et al., 1992).

Existen muchas posturas que defienden si hay o no repercusiones reproductivas al utilizar semen congelado en el ICSI, por lo que tocaría valorar que tiene más peso al final del día. Ya sea utilizar semen congelado que presentará una menor tasa de recuperación de espermatozoides móviles pero que supuestamente han atravesado un filtro de selección entre espermatozoides deficientes y espermatozoides competentes. O emplear semen fresco con espermatozoides que no presentan daño alguno ya que no fueron sometidos al proceso de congelación-descongelación, y que aparentemente tienen íntegro su ADN.

El impacto de la criopreservación en el espermatozoide se puede observar en distintos parámetros seminales, Aizpurua y colaboradores hablan de que la calidad seminal se conserva en mejores condiciones en la vitrificación que en la congelación lenta y lo asocian a varias causas. La diferencia en motilidad se relaciona a que puede ser que la vitrificación preserve mejor la integridad de la función y estructura mitocondrial evitando que la producción de ATP se vea comprometida y que los microtúbulos que participan en la motilidad funcionen adecuadamente. En cuanto a la vitalidad, los cambios de temperatura, las microlesiones por cristales de hielo, los cambios osmóticos, la deshidratación y la rehidratación que se experimenta en la congelación lenta pueden provocar daños celulares irreparables, observándose un mejor porcentaje de vitalidad en la vitrificación donde no existen estos factores.

La formación de cristales de hielo extracelular es el principal factor físico al que se le atribuyen las alteraciones morfológicas que ocurren durante la criopreservación. La vitrificación al ser una técnica que impide la formación tanto de cristales intracelulares como extracelulares presenta un menor porcentaje de alteraciones en la morfología comparado con la congelación lenta donde si hay formación de cristales, los resultados de Aizpurua et al. coinciden con lo antes mencionado. Además, se habla de otra posible explicación que puede justificar el por qué existe menor porcentaje de daño en la vitrificación, y es porque no existe un efecto negativo en la célula a falta de que no hay un cambio rápido de osmolaridad provocado por la adición y eliminación de crioprotectores junto con la entrada y salida de agua.

Para asegurar una correcta y adecuada transmisión del material genético paterno al embrión es necesaria la óptima conservación de la integridad del ADN durante todo el proceso de criopreservación. La presencia de fragmentación del ADN puede tener un efecto negativo de gran magnitud no solamente en las etapas de desarrollo embrionario, sino que también durante la

infancia y vida adulta. La diferencia obtenida en el porcentaje de fragmentación del ADN entre la vitrificación y la congelación lenta en la investigación de Aizpurua y colaboradores se puede atribuir a que la congelación lenta emplea glicerol, una sustancia que participa en la activación de las caspasas que eventualmente provocará fragmentación en el material genético.

El estrés oxidativo también juega un papel muy importante en la fragmentación de ADN, basándose en los resultados se propone que después de la vitrificación existe una menor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a diferencia de la congelación lenta (Aizpurua et al., 2017). En los estudios de Meseguer et al. se correlaciono un incremento del daño oxidativo en el ADN espermático con una baja tasa de formación de blastocistos (Meseguer et al. 2008). Por esto es importante tratar de reducir el daño al ADN al realizar técnicas de criopreservación para así mejorar los resultados finales del ciclo.

En la investigación de Zibri et al. se obtuvo como resultado que la criopreservación tiene efectos deletéreos en el ADN espermático incluyendo la fragmentación del ADN y la oxidación. Son necesarios más estudios que permitan conocer el mecanismo por el cual el método de congelación/descongelación afecte la integridad del ADN espermático (Zibri et al. 2010).

Así como existen estudios que apoyan que si existen diferencias entre utilizar espermatozoides criopreservados utilizando la congelación lenta y espermatozoides vitrificados, existen otros estudios que establecen lo contrario. Según los resultados arrojados por los estudios de Mohamed y colaboradores se concluye que ninguna técnica es superior a la otra, sino que dan resultados similares en cuanto a vitalidad, motilidad y el potencial de membrana mitocondrial. La única ventaja en la que hacen hincapié es que la vitrificación es una técnica más rápida, sencilla, barata y que al no utilizar crioprotectores permeables no existe peligro por la toxicidad de estos. Aun no habiendo encontrado diferencias significativas entre estas dos técnicas, concluyen que en un futuro se espera que la vitrificación ofrezca cierta ventaja en el resultado final del tratamiento.

La discordancia entre los diferentes estudios se puede atribuir a diferentes factores, algunos de ellos son que el tamaño muestral no es el ideal, la utilización de diferentes protocolos de congelación, diferentes pruebas para evaluar la integridad del ADN y diferentes formas de preparación previa del semen para la congelación (Di Santo et al., 2012). Una de las limitaciones de la mayoría de los estudios que se discutieron en el trabajo es que solamente utilizaron muestras que presentaban parámetros considerados normales, sería interesante evaluar si existe o no

diferencia entre muestras con algún diagnóstico clínico importante. Además, es conveniente mencionar la limitada literatura que existe acerca de la valoración del éxito reproductivo tomando en cuenta tasas de implantación, tasas de recién nacidos vivos, etcétera, en cuanto a la vitrificación vs. la congelación lenta.

CONCLUSIONES

La congelación espermática es una herramienta con múltiples beneficios entre ellas preservar la fertilidad cuando esta puede verse comprometida en un futuro. Una de las ventajas que se logró observar en el trabajo es que las muestras pueden criopreservarse por un tiempo indefinido ya que los diferentes periodos de almacenamiento no son un factor influyente en el éxito reproductivo. A pesar de ser un procedimiento realizado de manera rutinaria en las TRAs hay aspectos en los que falta profundizar más para valorar si realmente el proceso provoca un daño significativo en la morfología espermática, la fragmentación de ADN y la integridad de membranas.

Actualmente existe mucha literatura que respalda que el proceso de congelación-descongelación tiene efectos negativos en la movilidad y vitalidad espermática al disminuirlas. Se espera que en un futuro la vitrificación, una técnica más rápida, sencilla y barata, se optimice para disminuir el impacto de este proceso y ofrecer ciertas ventajas en el resultado final del tratamiento.

En conclusión, se ha demostrado que el semen fresco presenta un mayor éxito reproductivo que el semen congelado, por lo que aún falta mucho camino por adelante para que en un futuro sea indiferente que tipo de muestra utilizar, fresca o congelada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lewis, S. E., John Aitken, R., Conner, S. J., Iuliis, G. D., Evenson, D. P., Henkel, R., Giwercman, A., & Gharagozloo, P. (2013). The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reproductive biomedicine online*, 27(4), 325–337. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.06.014>
2. Agarwal, A., Mulgund, A., Alshahrani, S., Assidi, M., Abuzenadah, A. M., Sharma, R., & Sabanegh, E. (2014). Reactive oxygen species and sperm DNA damage in infertile men presenting

- with low level leukocytospermia. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 12, 126. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-126>
3. Fernández, A., Gonzalvo, M., Clavero, A., De Assín, R., Zamora, S., Rabelo, B., Ramírez, J., Yoldi, A., & Castilla, J. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *ASEBIR*, 14(1), 17–25.
 4. Medrano, L., Enciso, M., Gomez-Torres, M. J., & Aizpurua, J. (2019). First birth of a healthy infant following intra-cytoplasmic sperm injection using a new permeable cryoprotectant-free sperm vitrification protocol. *Cryobiology*, 87, 117–119. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.01.014>
 5. Le, M. T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, T. T., Nguyen, V. T., Nguyen, T. T. A., Nguyen, V. Q. H., & Cao, N. T. (2019). Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 234, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2019.01.001>
 6. Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances in urology*, 2012, 854837. <https://doi.org/10.1155/2012/854837>
 7. Tongdee, P., Sukprasert, M., Satirapod, C., Wongkularb, A., & Choktanasiri, W. (2015). Comparison of Cryopreserved Human Sperm between Ultra Rapid Freezing and Slow Programmable Freezing: Effect on Motility, Morphology and DNA Integrity. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*, 98 Suppl 4, S33–S42.
 8. Kennedy, W. P., Kaminski, J. M., Van der Ven, H. H., Jeyendran, R. S., Reid, D. S., Blackwell, J., Bielfeld, P., & Zaneveld, L. J. (1989). A simple, clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. *Journal of andrology*, 10(3), 221–231. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1989.tb00092.x>
 9. Tamburrino, L., Traini, G., Marcellini, A., Vignozzi, L., Baldi, E., & Marchiani, S. (2023). Cryopreservation of Human Spermatozoa: Functional, Molecular and Clinical Aspects. *International journal of molecular sciences*, 24(5), 4656. <https://doi.org/10.3390/ijms24054656>
 10. Martínez, J. (2013). Factores que afectan al proceso de criopreservación de los espermatozoides humanos. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10201/36168>

11. Huang, C., Lei, L., Wu, H. L., Gan, R. X., Yuan, X. B., Fan, L. Q., & Zhu, W. B. (2019). Long-term cryostorage of semen in a human sperm bank does not affect clinical outcomes. *Fertility and sterility*, 112(4), 663–669.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.06.008>
12. De Croo, I., Van der Elst, J., Everaert, K., De Sutter, P., & Dhont, M. (1998). Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Human reproduction* (Oxford, England), 13(7), 1893–1897. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.7.1893>
13. Borges, E., Jr, Rossi, L. M., Locambo de Freitas, C. V., Guilherme, P., Bonetti, T. C., Iaconelli, A., & Pasqualotto, F. F. (2007). Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Fertility and sterility*, 87(2), 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.06.032>
14. Kuczyński, W., Dhont, M., Grygoruk, C., Grochowski, D., Wołczyński, S., & Szamatowicz, M. (2001). The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa--a prospective randomized study. *Human reproduction* (Oxford, England), 16(10), 2109–2113. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.10.2109>
15. Aizpurua, J., Medrano, L., Enciso, M., Sarasa, J., Romero, A., Fernández, M. A., & Gómez-Torres, M. J. (2017). New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Human reproduction* (Oxford, England), 32(10), 2007–2015. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex281>
16. Ali Mohamed M. S. (2015). Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study. *Iranian journal of reproductive medicine*, 13(10), 633–644.
17. de Paula, T. S., Bertolla, R. P., Spaine, D. M., Cunha, M. A., Schor, N., & Cedenho, A. P. (2006). Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertility and sterility*, 86(3), 597–600. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.01.047>
18. Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I. I., Montag, M., Dessole, S., Nawroth, F., & Van Der Ven, H. (2004). Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biology of reproduction*, 71(4), 1167–1173. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028811>

19. Gamzu, R., Yogev, L., Yavetz, H., Homonnai, Z. T., Hiss, Y., & Paz, G. (1992). Fresh and frozen-thawed human sperm bind in a similar pattern to the zona pellucida in the hemizona assay. *Fertility and sterility*, 58(6), 1254–1256. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)55582-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)55582-4)
20. Meseguer, M., Martínez-Conejero, J. A., O'Connor, J. E., Pellicer, A., Remohí, J., & Garrido, N. (2008). The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertility and sterility*, 89(5), 1191–1199. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.005>
21. Zribi, N., Feki Chakroun, N., El Euch, H., Gargouri, J., Bahloul, A., & Ammar Keskes, L. (2010). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and sterility*, 93(1), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.09.038>