

11217
56
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION

I. S. S. S. T. F.

HOSPITAL REGIONAL "LIC. ADOLFO LOPEZ MATEOS"

TEMA

"CRIOPRESERVACION DE SEMEN HUMANO"

TRABAJO DE INVESTIGACION QUE PRESENTA EL

DR. MANUEL GARCIA ROMERO

PARA OBTENER EL TITULO DE LA ESPECIALIDAD DE

GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

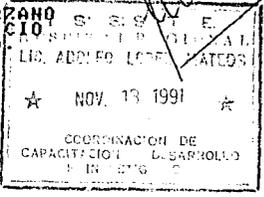
MEXICO, D.F., NOVIEMBRE DE 1991.



DR. JAVIER DAVIDA TORRES
COORDINADOR DE CAPACITACION
E INVESTIGACION.

DR. JAIME HERNANDEZ BUENA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO.

DR. OSCAR TREJO SOLORZANO
COORDINADOR DEL SERVICIO
DE GINECO-OBSTETRICIA.



Subdirección General Medicina

Unidad de los Servicios de Enseñanza e Investigación
Departamento de Investigación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1993



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 está 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.

TITULO: CRIOPRESERVACION DE SEMEN HUMANO

AUTOR: MANUEL GARCIA ROMERO

ASESORES: DR. JAIME HERNANDEZ RIVERA

BIOL. V. M. ALONSO CHAVEZ OLIVARES

VOCAL TITULAR DE INVESTIGACION EN GINECOOBSTETRICIA

DRA. Ma. DEL CARMEN MARTINEZ HERNANDEZ

DR. ENRIQUE ELGUERO PINEDA
JEFE DE INVESTIGACION



INDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	4
MATERIAL Y METODOS.....	12
RESULTADOS.....	14
DISCUSION.....	16
CUADROS.....	18
BIBLIOGRAFIA.....	23

RESUMEN

De las parejas que presentan esterilidad. el 45 % corresponde al varón, con problemas como: la oligozoospermia, la azoospermia, la astenozoospermia, la teratozoospermia, la necrozoospermia y sus asociaciones. Estos problemas en el varón nos han conducido a buscar una alternativa de tratamiento para aquellas parejas que se encuentren comprometidas con esta entidad.

En la unidad de Biología de la Reproducción del Hospital Regional "Lic. Adolfo Lopez Mateos" del I.S.S.S.T.E. se ha montado la técnica de Criopreservación de Semen Humano a temperaturas de -196 grados centígrados en Nitrogeno Líquido, permitiendo almacenar muestras. por varios años sin que existan alteraciones Genéticas en los espermatozoides. Hasta el momento se han obtenido por esta técnica. 4 productos en buen estado y 3 pacientes con embarazo en evolución.

PALABRA CLAVE: Criopreservación. Banco de Semen.

SUMMARY

In couples who present Sterility, 45 % corresponds to male patients with following diseases: Oligozoospermia, Azoospermia, Astenozoospermia, Teratozoospermia, Necrozoospermia and their associations. In male problems, was brought tretment alternative for find themselves couples with this entitv.

In Biology Reproduction Unit to Hospital Regional "Lic Adolfo Lopez Mateos" I.S.S.S.T.E., we was provided the technique of Human Cryopreserved Sperm at -196 centigrades in Liquid Nitrogen, for storage samples for many years, without Genetic diseases.

In these moment we have achieved 4 healtly infant's and 3 pregnant women in evolution.

KEY WORD: Cryopreservation. Semen Cryopreservation.

INTRODUCCION

Se considera que el 45% de los problemas que cursan con esterilidad son atribuidos al factor femenino y 45% al factor masculino, el 10% son factores compartidos por la pareja.

Con los avances de la ciencia ha sido posible efectuar mayor número de diagnósticos de esterilidad de causa masculina pero desafortunadamente muchos de los padecimientos no responden al tratamiento médico o no tienen tratamiento.

La Inseminación Artificial con semen de donador es uno de los métodos de tratamiento para la esterilidad masculina.

En México desde hace más de 20 años se ha venido practicando con buenos resultados y es bien aceptado.

El aumento de las enfermedades transmitidas por vía sexual y el conocimiento de alteraciones genéticas como causas de esterilidad obliga que los donadores sean meticulosamente estudiados por lo que la Criopreservación de semem humano parece ser la solución.

Las indicaciones de la Inseminación Artificial Heteróloga o de donador son en los casos de:

- AZOOSPERMIA
- NECROSPERMIA
- OLIGOZOOSPERMIA
- ASTENOSPERMIA
- OLIGOASTENZOOSPERMIA
- TERATOZOOSPERMIA

- ENFERMEDADES HEREDITARIAS GRAVES EN LA PAREJA:
- + HOMBRE Rh POSITIVO HOMOCIGOTO
- + MADRE Rh NEGATIVO SEVERAMENTE⁴ SENSIBILIZADA

Para el diagnóstico de la esterilidad masculina el estudio de la espermatobioscopia sigue siendo primordial para investigar las posibles causas de esterilidad.

En la Unidad de Biología de la Reproducción del Hospital Regional Licenciado Adolfo Lopez Mateos del I.S.S.S.T.E. desde el año de 1987 se estableció la metodología indispensable para llevar a cabo este análisis tomando como base la técnica sugerida por la Organización Mundial de la Salud de 1980, la valoración efectuada por personal capacitado nos proporciona más información sobre la calidad del semen para precisar las medidas terapéuticas que puedan ser utilizadas. En el análisis microscópico de una muestra de semen es necesario identificar, la movilidad, la vitalidad y la estructura general de los espermatozoides, así como la presencia de elementos distintos a las células reproductoras.

Los espermatozoides muestran enormes variaciones en su movilidad y proyección pero cuando menos la mitad debe tener un desplazamiento rectilíneo para que la muestra sea considerada como normal.

La severa disminución en la movilidad de los espermatozoides se llama ASTENSERMIA y es de difícil

tratamiento. Cuando es un proceso infeccioso el que causa la inmovilidad del esperma, la adhesión bacteriana cuando es a nivel de la cola impide su desplazamiento, incluso a las endotoxinas secretadas por estos microorganismos se les confieren propiedades espermicidas e inmovilizantes.

Se han utilizado medicamentos para estimular la movilidad espermática, como la Cafeína, la Kalicreína, la estreptoquinasa con resultados variables, por lo que la Inseminación Artificial con semen donado sería la indicación.

La presencia de aglutininas espermáticas se ha demostrado en el plasma seminal de hombres estériles y que son consideradas causales de esterilidad cuando los títulos son mayores de 1:32.

La vitalidad espermática es posible determinarla por medio de algún colorante supravital, como la Eosina, los espermatozoides muertos incorporan el colorante porque el aislamiento que le proporciona la membrana nuclear ya no existe por lo que es posible diferenciarlos de los vivos porque estos son translúcidos y será posible obtener un porcentaje de vitalidad.

Cuando una muestra presenta espermatozoides muertos en su totalidad es considerado como NECROSPERMIA.

Para poder considerar la cantidad de espermatozoides en una muestra se lleva a cabo una dilución y el conteo es determinado con un hemocitómetro, y si la muestra contiene por arriba de los 20 millones por mililitro se considera la muestra

dentro de los límites de normalidad, si la concentración es inferior a los 20 millones de espermatozoides por mililitro puede ser causante de esterilidad y es llamada OLIGOZOOSPERMIA. En los casos de oligozoospermia la determinación de prolactina es útil ya que la HIPERPROLACTINEMIA se asocia a impotencia y oligozoospermia, el tratamiento con dopaminérgicos como la bromocriptina y la cirugía cuando hay microadenomas tienen resultados favorables .

En la AZOOSPERMIA hay ausencia total de espermatozoides y la alternativa solo es realizar la Inseminación Artificial con semen Donado.

La morfología de los espermatozoides es sumamente importante, porque nos puede indicar alteraciones en la espermatogénesis, la técnica de tinción de Papanicolaou en una laminilla con espermatozoides fijados nos permite una observación detallada de las estructuras, por lo que facilita diferenciar los espermatozoides normales de los anormales. De los espermatozoides podemos describir alteraciones de la cabeza, pieza media o en la cola. Un porcentaje mayor al 40% de formas anormales se considera como TERATOSPERMIA patología que no tiene tratamiento, en las preparaciones teñidas se pueden observar células espermáticas inmaduras que son células sin un desarrollo completo, Leucocitos, Células epiteliales.

El espermatozoide recién eyaculado debe sufrir una serie de cambios para adquirir la capacidad de fecundar al OVOCITO,

esta capacidad la adquiere durante el paso del espermatozoide por el tracto genital femenino. este proceso lleva consigo la REACCION DEL ACROSOMA que es necesaria para penetrar las cubiertas del ovocito y para la fusión del espermatozoide con el ovocito. La capacitación "In vitro" puede ser llevada a cabo por la separación del liquido seminal . el lavado de los espermatozoides en medio de cultivo y la incubación a 37 grados centigrados por un espacio de 30 minutos , con una atmósfera y humedad específica.

Una técnica complementaria del análisis básico del semen es el ensayo de penetración llamado también "PRUEBA DEL HAMSTER", esta técnica consiste en obtener mediante estimulación hormonal ovocitos de Hamster dorado, a los que se les retira las células del "cumulus" y la zona pelúcida mediante tratamientos enzimáticos incubándose de 1 a 5 horas en medio de cultivo, lo que permite al espermatozoide descondensar su material nuclear en los ovocitos lo que indica su capacidad fertilizante.

De manera que la descondensación de espermatozoides en ovocitos de Hamster sin zona pelúcida, el examen básico del semen y la migración del espermatozoide en moco cervical pueden darnos una buena orientación de la capacidad fertilizante del espermatozoide humano.

El contar con un BANCO DE SEMEN tiene gran importancia terapeutica en parejas con problemas de esterilidad.

El establecimiento de un CRIOBANCO DE SEMEN HUMANO es considerado seguro, eficiente, práctico y con la ventaja de mantener la función reproductiva normal de los espermatozoides aún estando almacenados por periodos indefinidos en Nitrógeno Líquido a temperaturas de hasta MENOS 196 GRADOS CENTIGRADOS, la Inseminación Artificial con Semen Connelado, tiene como ventajas, conservar y concentrar muestras de un mismo paciente, disponer de la muestra de semen en el momento que se requiera, evitar la presencia del donador, se pueden realizar varias inseminaciones en un mismo ciclo, conservar muestras de pacientes que serán sometidos a radioterapia y quimioterapia y examinar las muestras para descarta enfermedades genéticas, infecciosas, etc...

El equipo del BANCO DE SEMEN consiste en un TERMO con un recubrimiento de fibra de vidrio que impide la perdida de calor y rodeado por aluminio, canastillas de plástico son las que sostienen las barillas de aluminio donde son colocados los CRIOTUBOS de plástico no tóxico donde son colocadas las muestras con el CRIOPROTECTOR, las muestras se mantienen por 10 a 15 minutos en vapores de Nitrógeno Líquido después de lo cual son bajadas hasta alcanzar temperaturas de MENOS 196 GRADOS CENTIGRADOS.

Existen indicaciones y ventajas específicas que nos permiten ofrecer esta alternativa terapéutica en la Unidad de Biología de la Reproducción del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos del I.S.S.S.T.E.

4

MATERIAL Y METODOS

De un estudio prospectivo, realizado en 77 inseminaciones en la consulta externa de la Unidad de Biología de la Reproducción, del Hosp. Reg. "Lic. Adolfo Lopez Mateos" del I.S.S.S.T.E. de Marzo de 1989 a Octubre de 1991 se seleccionaron parejas, cuyo factor masculino sea el causante de la esterilidad de edades que fluctuaran entre los 20 y 35 años de edad.

A los donadores se les realizó estudios previos genéticos, de espermatobioscopia y espermocultivo. y a las parejas que presentaran procesos infecciosos se les proporcionó tratamiento quedando excluidas las que no respondieran al mismo.

La obtencion de las muestras es por masturbación, con una abstinencia sexual de 72 horas, realizandoseles pruebas de "calidad" de semen, estudios bacteriológicos y serológicos, para evitar propagar infecciones en las pacientes inseminadas. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 minutos homogenizandose en una proporcion de 1:1 con el crioprotector. El crioprotector consta de glicerol al 10% en medio de fertilización (Ham F-10 + suero de cordón fetal Humano al 7.5%).

El homogenizado se colocó en criotubos en volúmenes de 1 ml. con su respectivo número de registro. Los criotubos son colcados en la boca del termo de Nitrógeno Líquido, por 10-15 min. descendiendo al interior a temperaturas de -196 grados centígrados, hasta que la muestra sea requerida.

La descongelación de la muestra se llevó a cabo 1 hora antes de la inseminación intrauterina, de la siguiente manera:

Se retiró el criotubo del termo de Nitrógeno Líquido dejándose a temperatura ambiente por 15 minutos, para posteriormente ser incubada a 37 grados centígrados con una mezcla triple de gases (CO₂, O₂ y N₂), por otros 15 minutos. Se observó la muestra determinando si mantuvo las siguientes características: Movilidad de más de 5 millones de espermatozoides por ml., Vitalidad de por lo menos el 40% y desplazamiento rectilíneo.

Se realizaron las inseminaciones intrauterinas alrededor del día de la ovulación según la curva de temperatura basal.

RESULTADOS

El tipo de esterilidad que presentaron los pacientes varones del grupo de estudio, tiene en su citología espermática, el siguiente porcentaje de anomalías: Oligospermia 40%, Azoospermia 30%, Astenospermia 15%. Teratospermia 10%. Necrospermia 3% y las asociaciones en un 2%. (Cuadro 1)

Las muestras precongeladas presentaron los rangos de movilidad óptimos establecidos como son la movilidad alta (75%), cuando los espermatozoides realizan un desplazamiento rectilíneo y que apenas pueden ser observados en el microscopio a 400X. Los de movilidad media (10%), con un desplazamiento similar o realizando grandes elipses con velocidad menor a los anteriores. Los de movilidad baja (5%), cuyo desplazamiento es en elipses pequeñas o que pueden ser seguidos con mucha facilidad por medio del microscopio a 400X y los inmóviles (10%), que no tienen desplazamiento alguno. (Cuadro 2)

Las muestras postcongelación presentaron un claro descenso en la movilidad espermática. los espermatozoides inmóviles aumentaron a un 40%, bajando los de movilidad alta al 20%, los de movilidad media presentaron un 30% y los de baja a 10%. (cuadro 3)

En la descongelación observamos una baja notable de la movilidad espermática, del 90% al 40% como se observa en el cuadro 3.

En el cuadro No. 4 observamos que de las 15 pacientes inseminadas con semen criopreservado, 4 se embarazaron en el 1er. ciclo, 2 en el 2o. y 1 en el 3er. ciclo. continuando el embarazo 3 y obteniéndose productos vivos en 4 pacientes.

Las restantes 8 pacientes a pesar de las subsecuentes inseminaciones no lograron el embarazo.

En el cuadro 5 observamos la curva de distribución, donde se ratifica la correlación entre embarazos e inseminaciones en los primeros ciclos.

DISCUSION

Los pacientes varones fueron estudiados previamente en el Laboratorio de la Unidad de Biología de la Reproducción, del Hosp. Reg. "Lic. Adolfo Lopez Mateos" del I.S.S.S.T.E., basandonos en el Manual de laboratorio para semen e Interacción de semen-moco cervical Humano, editado por la Organización Mundial de la Salud, en Singapore. Por lo que su esterilidad es comprobada.

A los donadores después entregar su muestra y pasar el control a que son sometidos, se les llevan a cabo estudios bacteriológicos y genéticos para corroborar el buen estado de las muestras. Solo las muestras que presentaron una excelente calidad fueron utilizadas para ser congeladas, como lo observamos en el cuadro 2.

Al descongelar las muestras se observó que tanto la vitalidad como la movilidad disminuyeron notablemente (Cuadro 3). Siendo del 90% al 40% la movilidad que nos indica, que si la muestra no tiene la calidad adecuada el porcentaje de recuperación de espermatozoides móviles podría no alcanzar el mínimo requerido para hacerse la inseminación.

En los cuadros 4 y 5 observamos que las pacientes que pudieron embarazarse en los primeros ciclos de inseminación, el factor masculino era realmente el problema, y en las pacientes que a pesar de proseguir con las inseminaciones no lograron embarazarse se observaron anomalías en sus gráficas de temperatura basal, o presentaron flujo cervico-vaginal que indicaba un proceso infeccioso.

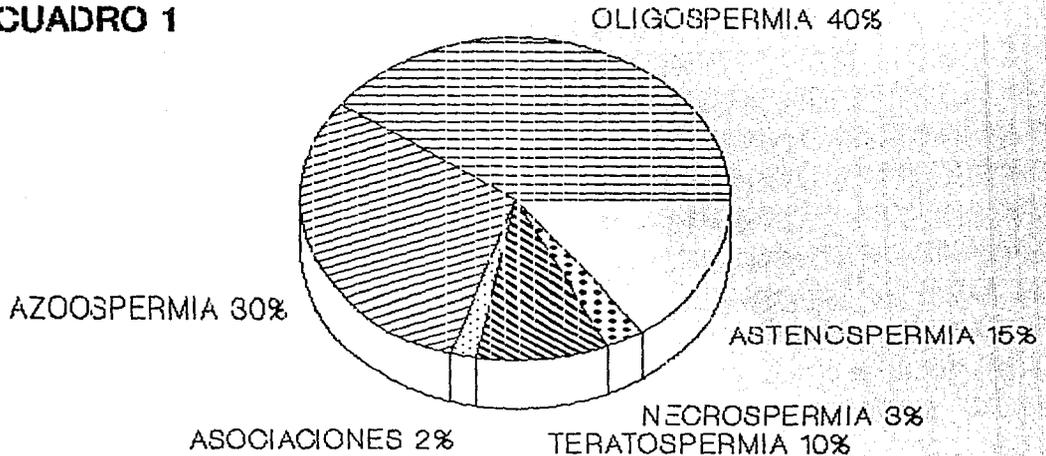
La probabilidad de transmitir una infección por medio de la muestra de semen criopreservado es mucho menor que la obtenida por relaciones sexuales, por el control de calidad con que se maneja dicha muestra.

La presente técnica es la indicada para ser utilizada en parejas con factor masculino de esterilidad. El poder criopreservar espermatozoides humanos nos permite poder inseminar en el momento y con la frecuencia deseada en pacientes de la Unidad de Biología de la Reproducción. También es posible estudiar a los donadores para evitar en gran medida que alguna de las muestras puedan causar algún proceso infecto-contagioso. Criopreservadas puedan estar infectadas.

CITOLOGIA ESPERMATICA

% DE PACIENTES CON ALTERACION ESPERMATICA

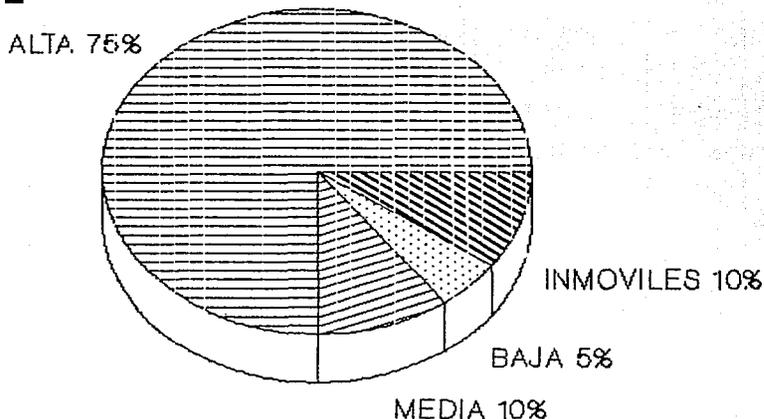
CUADRO 1



**Fuente: Información Obtenida del H.R.L.A.L.M.
SERVICIO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA**

MOVILIDAD ESPERMATICA MUESTRA PRECONGELACION

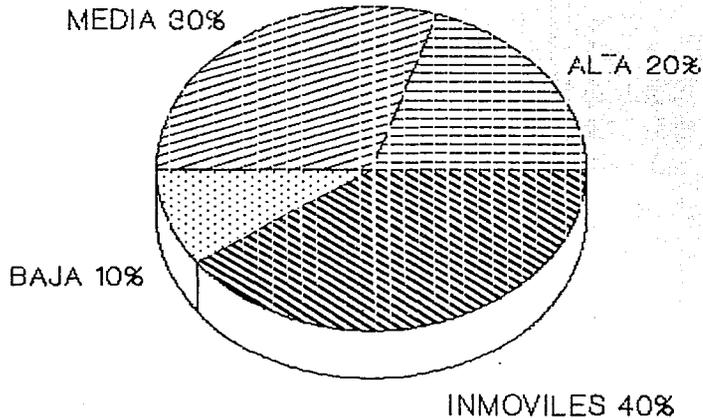
CUADRO 2



**Fuente: Información Obtenida del H.R.L.A.L.M.
SERVICIO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA**

MOVILIDAD ESPERMATICA MUESTRA POSTCONGELACION

CUADRO 3



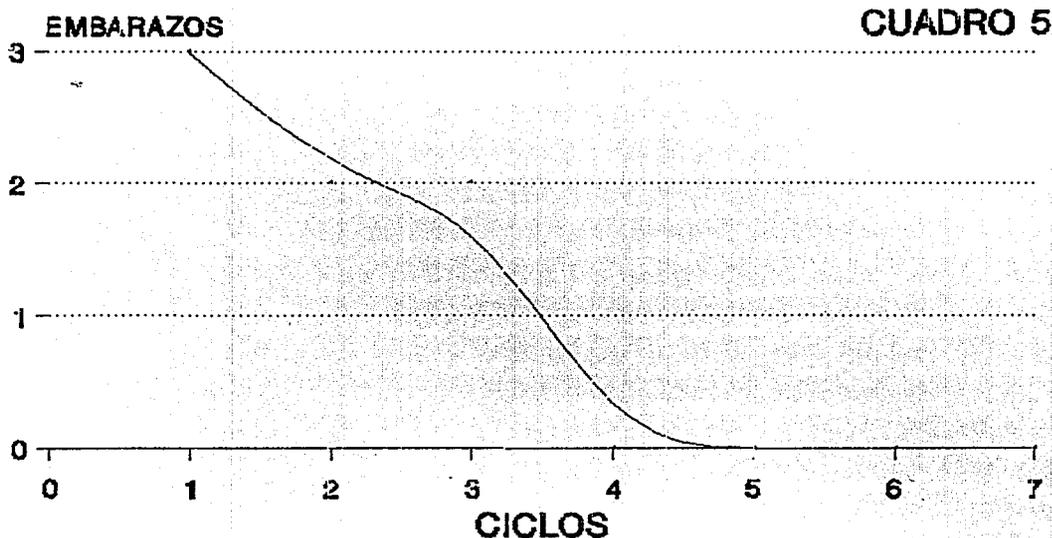
**Fuente: Información Obtenida del H.R.L.A.L.M.
SERVICIO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA**

RESULTADOS : 77 INSEMINACIONES HETEROLOGAS CON SEMEN CONGELADO

PACIENTE No.	INSEMINACION No.							EMBARAZO	NACIDOS VIVOS
	1	2	3	4	5	6	7		
1	X							?	3200
2	X							?	3400
3							X		
4		X						?	3000
5							X		
6							X		
7							X		
8			X					?	3200
9							X		
10							X		
11	X							?	
12	X							?	
13		X						?	
14							X		
15							X		

**BIOLOGIA H.R.L.A.L.M.
DE LA REPRODUCCION
I.S.S.S.T.E.**

INSEMINACION INTRAUTERINA CON SEMEN CONGELADO



Fuente: Información Obtenida del H.R.L.A.L.M.
SERVICIO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

BIBLIOGRAFIA

4

1. Critser J.K., Arneson B.W. et.al.: Cryopreservation of human spermatozoa II. Post thaw chronology of motility and of zona-free Hamster ova penetration. Fertil Steril 47,6:980. 1987.
2. Crister J.K., Huse-Bebda, et.al.: Cryopreservation of human spermatozoa III. The effect of cryoprotectants on motility. Fertil Steril. 50,2:314. 1988.
3. Critser J.K., Arneson B.W. et.al.: Cryopreservation of hamster oocytes: Effects of vitrification or freezing on human sperm penetration of zona-free hamster oocytes. Fertil Steril. 46, 2:277. 1986.
4. Garcia C.R., Mastrolanni L., et.al.: Current Therapy of Infertility - 3. B.C. Decker Inc. ED. Paqs. 149-287. 1988.
5. Hafez E.S.E.: Interdisciplinary Andrology. Arch. Androl. 18:1-178. 1987.
6. Hammit D.G. Aschenbrenner et.al.: Cuture of cytomegalovirus frozen-thawed semen. Fertil Steril. 49,3:554. 1988.
7. Kremmer J. Dijkhuis J.R.H. et.al.: A simplified method for and storage of human semen. Fertil Steril. 47,5:838. 1987.
8. Tuscker M.J. and Ahujak : Cryopreservation of human spermatozoa : an assesment of methodology using Rhodamine 123. Arch. Androl. 17:179. 1986.
9. World Health Organization (W.H.O.). Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Semen-Cervical mucus Interaction. Pq. 7-32. 1980.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA