



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Evaluación de la motilidad espermática usando dos crioprotectores

Evaluación da motilidade espermática empregando dous
crioprotectores

Sperm motility evaluation using two cryoprotectants



MÁSTER

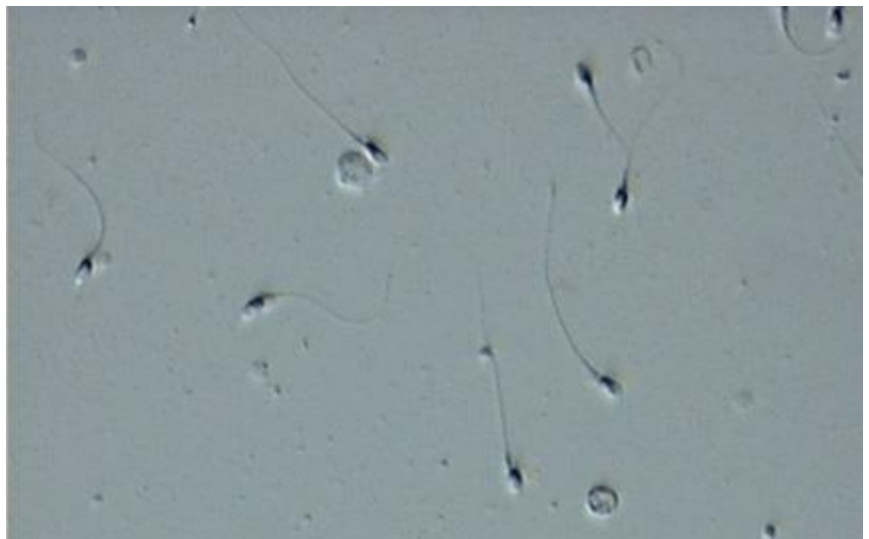
UNIVERSITARIO

EN BIOLOGÍA

MOLECULAR,

CELULAR Y

GENÉTICA



TRABAJO FIN DE MÁSTER

SANDRA ABALDE GRAÑA

Directora: M^a Esther Rendal Vázquez

Co-director: Jacinto Sánchez Ibáñez

26 de Junio de 2015

CURSO 2014/2015

Agradecimientos

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a la directora de mi trabajo, la Dra. Esther Rendal, sin la cual no sería posible la realización de este. Muchas gracias por tu ayuda, paciencia, dedicación y sobre todo por haberme ayudado a aprender y compartir tus conocimientos conmigo. También darle las gracias a la Dra. Mariana García por su implicación y haber aportado su experiencia.

De la misma forma, agradezco a todo el personal de la Unidad de Criobiología-Banco de Tejidos y del Laboratorio de Fecundación *in vitro* del CHUAC por haberme ofrecido una mano en todo momento y haber hecho las horas de laboratorio más entretenidas; también al personal del Laboratorio de área por la cesión de las muestras de semen para el estudio y a Sonia Pértega, de la Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística.

Aprovecho para dar las gracias a todas esas personas que son un apoyo constante: a mis amigos y especialmente a mi familia y a Javi, por confiar en mí, haberme brindado esta oportunidad y darme fuerzas siempre.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Infertilidad	2
<i>Infertilidad masculina</i>	2
1.2 El esperma	3
1.3 Estrategia de la exploración de la infertilidad masculina	5
1.4 Criopreservación seminal	7
<i>Criopreservación en pacientes oncológicos</i>	10
<i>Proceso de congelación</i>	12
<i>Proceso de descongelación</i>	13
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1 Material	15
3.2 Diseño experimental	15
3.3 Proceso de criopreservación de las muestras	16
<i>Capacitación mediante gradientes</i>	17
<i>Adición del medio de criopreservación</i>	17
<i>Congelación en rampa</i>	18
<i>Congelación en perlas</i>	19
<i>Almacenamiento</i>	20
3.4 Proceso de descongelación de las muestras	20
3.5 Variables a estudio	21
3.6 Tratamiento estadístico	21
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	33

RESUMEN

La infertilidad, es un problema que afecta a una gran cantidad de parejas. Una de sus causas es la disminución de la calidad seminal debido, por ejemplo, al consumo de tabaco y a tratamientos gonadotóxicos (quimioterapia y radioterapia). La criopreservación seminal es la técnica que permite conservar y almacenar espermatozoides durante largos periodos de tiempo sin que pierdan su capacidad fecundante; siendo esta una herramienta fundamental en reproducción asistida. El objetivo de este trabajo ha sido optimizar la técnica de criopreservación, en cuanto a viabilidad y supervivencia de los espermatozoides a este proceso. Para ello se llevó a cabo un estudio, sobre muestras de pacientes en estudio por problemas de fertilidad, en el que se compararon dos medios de criopreservación (SpermCryo™All-round y CryoSperm™) y la aplicación o no de un baño en nitrógeno líquido a las muestras (previo a su almacenamiento); así como el efecto del tiempo que transcurre desde la eyaculación hasta el procesado sobre la calidad de la muestra. Las posibles variaciones fueron estudiadas con un analizador automático, mediante la realización de test pre- y post-congelación para comprobar la movilidad espermática.

Los resultados no muestran diferencias entre ambos medios crioprotectores, pero parece haber una tendencia a obtener mejores resultados de movilidad post-descongelación con uno u otro dependiendo de características de la muestra. Por otro lado, el baño en nitrógeno líquido no parece tener efecto sobre el resultado post-descongelación. Sin embargo, hay que destacar la importancia de la rapidez en el procesado de las muestras de semen una vez licuado, para evitar la disminución de la calidad espermática.

Para mejorar los resultados post-descongelación la clave radica en la necesidad de ajustar el protocolo de congelación a las características de la muestra, así como una correcta realización del protocolo de criopreservación (selección y adición del medio crioprotector...); favoreciendo así la gestión de la infertilidad y el éxito de las técnicas de reproducción asistida.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Infertilidad*

La infertilidad es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el estado en el cual una pareja que desea tener hijos es incapaz de concebir tras 12 meses manteniendo relaciones sexuales sin protección. Este es un fenómeno que afecta aproximadamente al 15% de las parejas que intentan concebir (Matorras, 2011).

En 2011 existían en España casi un millón de parejas demandantes de asistencia reproductiva y cada vez son más las que acuden a clínicas de reproducción asistida. También se ha incrementado la demanda de TRA (Técnicas de Reproducción Asistida) por parte de nuevos modelos de familia, como las madres solteras y las parejas de homoparentales (Gómez, 2011; Matorras, 2011; Brassesco-Julio, 2015).

Se estima que el 10% de los ciclos de reproducción asistida de Europa se realizan en España, donde nacen más de 10.000 niños al año por TRA superando así los 200.000 al año en todo el mundo (Matorras, 2011; EFE, 2014; Núñez, 2015).

En la actualidad las causas más comunes de infertilidad son la edad materna (debido a que la probabilidad de embarazo desciende con la edad de la madre tanto en concepción natural como en TRA) y el fallo en la función espermática (Matorras, 2011).

Infertilidad masculina

En casi la mitad de los casos de infertilidad masculina la causa radica en una hipofertilidad exclusiva o asociada a la femenina. La hipofertilidad, o subfertilidad, es definida como la condición en la cual existe un estado reducido de fertilidad en uno o ambos miembros de la pareja. En consecuencia, la exploración de la pareja y la búsqueda de causas de hipofertilidad masculina son imperativas. El estudio del espermograma, o seminograma, que consiste en un análisis cuantitativo y cualitativo que permite conocer: cantidad de esperma eyaculado, concentración o número de espermatozoides, viscosidad, pH o color; así como características específicas de los espermatozoides como morfología, movilidad y vitalidad, entre otros parámetros, permite orientar hacia un origen masculino de este problema. Por lo tanto, la buena ejecución de los exámenes seminales es esencial para lograr una actuación terapéutica adaptada y eficaz (Poirot & Cherruau, 2005; Matorras, 2011; López *et al.*, 2012).

1.2 El esperma

El esperma es un líquido que contiene en suspensión los espermatozoides, producidos en los túbulos seminíferos de los testículos en dos etapas (Poirot & Cherruau, 2005; Arteaga & García, 2013):

1. La espermatogénesis, que es la producción de las espermátidas (células gaméticas inmaduras) a partir de las espermatogonias (células madre precursoras de los espermatozoides).
2. La espermiogénesis, que consiste en una modificación morfológica de la espermátida en espermatozoide (gameto maduro), con la formación del acrosoma y del flagelo.

Este proceso tiene una duración de unos 60 días, y en él se individualizan las diferentes partes del espermatozoide: la cabeza, que contiene el núcleo y el acrosoma, la pieza intermedia y el flagelo.

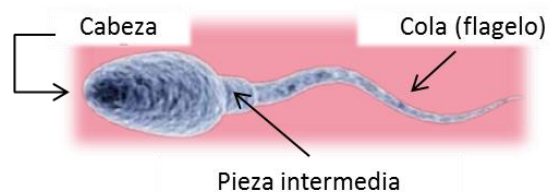


Figura 1. Imagen de un espermatozoide y sus diferentes partes.

En los testículos, los espermatozoides son inmóviles o móviles *in situ* y no fecundantes. Desde aquí son evacuados al epidídimo por los conductos espermáticos intratesticulares (túbulos rectos, *rete testis*) donde se produce al mismo tiempo reabsorción y secreción epididimaria (que aporta L-carnitina y α -1,4-glucosidasa neutra). Este período de maduración está asociado a cambios en las glucoproteínas de la membrana plasmática de la cabeza; es aquí, donde los espermatozoides adquieren su movilidad progresiva y su aptitud para la fecundación (Poirot & Cherruau, 2005; López *et al.*, 2012).

En el momento de la eyaculación, el líquido del epidídimo que contiene los espermatozoides es expulsado por el conducto deferente que acaba en la ampolla deferente, después pasa por los conductos eyaculadores hasta la uretra prostática, donde se añade la secreción prostática (rica en ácido cítrico, fosfatasa ácida, zinc e iones de magnesio). Al contraerse las vesículas seminales su secreción (que aporta fructosa y prostaglandinas) se descarga en los conductos eyaculadores (Carlson, 2005; Arteaga & García, 2013).

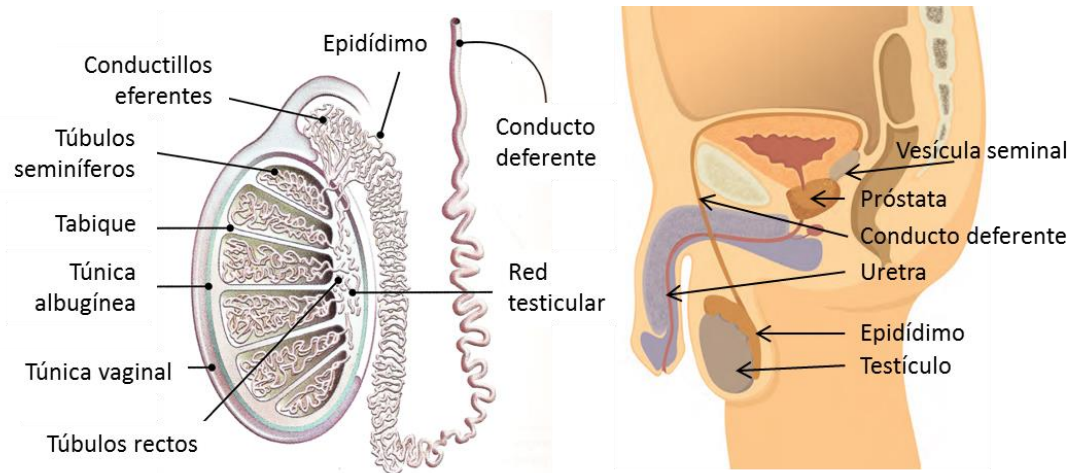


Figura 2. Esquema de las estructuras que intervienen en la producción del semen (Modificado de: Arteaga & García, 2013 y SEF, 2012).

El volumen de un eyaculado después de un lapso de abstinencia sexual de 3 a 5 días es de 2 a 6 mL, los cuales normalmente están compuestos por entre 40 a 250 millones de espermatozoides mezclados con líquido alcalino de las vesículas seminales (un 65%) y secreción ácida (pH: 6.5) de la próstata (un 30%) (Carlson, 2005; Poirot & Cherruau, 2005).

En cuanto a los caracteres físicos (Poirot & Cherruau, 2005):

- El espermatozoide presenta color blanquecino y consistencia viscosa.
- Coagula espontáneamente *in vivo* en la vagina, lo mismo que *in vitro* y luego se licua de nuevo en 20-30 min a 37°C.
- El pH del espermatozoide es neutro, entre 7.2 y 8, como resultado de la mezcla de la acidez prostática y la alcalinidad vesicular.

El plasma seminal es un medio rico y complejo, sirviendo como vehículo y como medio nutritivo y protector de los espermatozoides. Está compuesto por (Poirot & Cherruau, 2005; López *et al.*, 2012):

- Constituyentes minerales: Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{+2} , Zn^{+2} . El zinc es un catión dotado de poder bactericida. Su papel es estabilizar la condensación de la cromatina. Es transportado por el citrato y las proteínas.
- Glúcidos: sobre 0.39 mmol/L de glucosa y entre 5.5 y 27.5 mmol/L de fructosa (fuente de energía para los espermatozoides, producida a partir de la glucosa sanguínea).
- Ácidos orgánicos, como el ácido cítrico (anión principal, contribuye al mantenimiento de la presión osmótica del espermatozoide; existe una estrecha correlación entre las

concentraciones de zinc y citrato) y el ácido ascórbico (protector de los espermatozoides de cara a los radicales libres).

- Lípidos, con una concentración tres veces menor que en el plasma sanguíneo, como el colesterol o la glicerofosforilcolina.
- Esteroides, como la testosterona o la deshidroepiandrosterona.
- Prostaglandinas, proteínas y enzimas (como hidrolasas o deshidrogenasas). La α -1,4-glucosidasa es una hidrolasa que está en dos formas en el esperma: una forma ácida de origen prostático y una neutra epididimaria; en el epidídimo desempeñaría un papel en la maduración de los espermatozoides. La fosfatasa ácida es una enzima activa en la desfosforilación de los ésteres ortofosfóricos, la isoenzima hallada en el esperma es específica de la próstata.
- Otros constituyentes de pequeña masa molecular: aminoácidos, L-carnitina (la cual tiene un papel importante en el metabolismo de los espermatozoides bajo la forma de acetilcarnitina, desempeña un papel en la adquisición de la movilidad progresiva), espermidina, espermina (responsable del olor del esperma).

1.3 Estrategia de la exploración de la infertilidad masculina

Los trastornos de la espermatogénesis pueden ser de origen genético o estar ligados a factores extrínsecos (como el consumo de tabaco). Cuando se trata de causas genéticas los pacientes afectados producen pocos o ningún espermatozoide, o espermatozoides en número normal pero no fecundantes. Los factores extrínsecos afectan a la espermatogénesis durante la vida pre- y postpubescente, dando como resultado una producción reducida de espermatozoides y/o de su movilidad (Poirot & Cherruau, 2005; López *et al.*, 2012).

De manera global la estrategia durante la exploración de la fertilidad masculina constaría de cuatro fases: un interrogatorio que permite la investigación de los factores de riesgo (como la profesión y la exposición a diferentes tóxicos: disolventes, insecticidas, etc.), un examen clínico de las bolsas testiculares (que puede orientar hacia una azoospermia secretora o excretora, quistes testiculares o del epidídimo o la presencia de varicocele), los exámenes biopatológicos de primera intención y los exámenes de segunda intención (estudio de cariotipo y anomalías, anticuerpos antiespermatozoides...) (Poirot & Cherruau, 2005; López *et al.*, 2012).

Las pruebas analítico-clínicas de primera intención incluyen el espermiograma. Esta es la primera etapa biopatológica de la exploración de la fertilidad masculina, este examen orienta hacia

una participación masculina en la infertilidad de la pareja o bien la confirma; es también el punto de partida de un proceso etiológico (Poirot & Cherruau, 2005; López *et al.*, 2012).

Para una primera valoración de la fertilidad de un paciente, se deben realizar dos espermigramas con tres meses de intervalo. La muestra debe recogerse tras un periodo de abstinencia sexual de entre 3 y 5 días en un recipiente estéril y de un solo uso. El recipiente tras su recepción, se pondrá inmediatamente en una estufa a 37°C durante unos 30 min para que se produzca la licuefacción y el examen del espermatozoide deberá realizarse inmediatamente después de la licuefacción o dentro de la hora siguiente a su obtención (Poirot & Cherruau, 2005; WHO, 2010; López *et al.*, 2012).

Las características del plasma seminal sometidas a estudio son (WHO, 2010):

- Aspecto: un eyaculado normal tiene un aspecto opalescente, un color pardo debe hacer pensar en una hemospermia.
- Volumen: debe ser medido.
- Viscosidad: se evalúa después de la licuefacción, mediante una aspiración suave con pipeta y observando el modo en que el espermatozoide gotea por efecto de la gravedad. Esta será normal si el espermatozoide cae gota a gota y estará aumentada cuando no gotea o lo hace de forma filamentosa. Si se diera este segundo caso, la medida de la movilidad o la concentración pueden verse dificultadas.
- pH: se mide mediante tiras de papel de pH, normalmente entre 7.2 y 8. Valores por debajo de 7 sugieren una insuficiencia o una agenesia vesículo-deferente, un pH superior a 8 puede evocar una afección de la próstata.

Las características de los espermatozoides también han de ser estudiadas, tales como la movilidad y la concentración. La movilidad de los espermatozoides es a la vez un estudio cuantitativo, pues se realiza una estimación de los espermatozoides móviles, como cualitativo, al observar su tipo de movimiento. Esto debe realizarse a una temperatura de 37°C, ya que una temperatura diferente modificaría el movimiento espermático; las platinas calefactoras en el microscopio, facilitan este análisis (Poirot & Cherruau, 2005; WHO, 2010; López *et al.*, 2012).

Según el manual de la OMS se clasifica el movimiento de los espermatozoides en cuatro categorías:

- a: rápidos y progresivos.
- b: lentos y progresivos.
- c: móviles en el sitio.

- d: inmóviles.

Dichas categorías se expresan en porcentaje. Se considera normal la movilidad cuando el porcentaje de espermatozoides progresivos (suma de tipo a y tipo b), con al menos la mitad del tipo a, es superior al 40%. Al mismo tiempo se realiza una estima de la concentración de espermatozoides, esta se considera normal si el número de espermatozoides se encuentra entre 20 y 200 millones/mL. Por debajo de 20 millones/mL se habla de oligozoospermia y si es superior a 200 millones/mL de polizoospermia (Tabla 1). Es también importante observar la existencia de aglutinaciones de espermatozoides que pueden tener un origen inmunológico.

El eyaculado además de espermatozoides contiene otras células, las células redondas (células epiteliales de la uretra, células de la línea germinal o leucocitos) (Poirot & Cherruau, 2005; WHO, 2010).

Característica	Unidades	Límite inferior de referencia (intervalos de confianza al 95%)	Alteración
Volumen	mL	1.5 (1.4-1.7)	Hipospermia (aspermia)
pH	Unidades de pH	7.2	
Concentración espermática	10 ⁶ /mL	15 (12-16)	Oligozoospermia (Aspermia)
Nº total de espermatozoides	10 ⁶ /eyaculado	39 (33-36)	Oligozoospermia (Aspermia)
Movilidad total	% movilidad progresiva + no progresiva	40 (38-42)	Astenozoospermia
Movilidad a los 60 min de la eyaculación	% movilidad progresiva	32 (31-34)	Astenozoospermia
Morfología espermática	% normal	4 (3.0-4.0)	Teratozoospermia
Vitalidad	% vivos	> 58 (55-63)	Necrozoospermia

Tabla 1. Valores mínimos/rangos de referencia de la OMS (WHO, 2010) para algunas características del análisis de semen y sus alteraciones.

1.4 Criopreservación seminal

La congelación de semen, introducida sobre el año 1960, es la técnica que nos permite conservar espermatozoides a bajas temperaturas (-196°C) y mantenerlos durante largos periodos de tiempo sin que pierdan su capacidad fecundante; manteniendo así su viabilidad y funcionalidad y

frenando los procesos de envejecimiento y degeneración celular. Esta técnica está especialmente indicada en varones que van a someterse a vasectomía, tratamientos con quimioterapia o radioterapia, así como en aquellos que por diversas razones presenten dificultades para obtener una eyaculación normal o con muy mala calidad espermática. Existen otras situaciones en las que también es recomendable la criopreservación espermática como es el caso de pacientes que se encuentren en el programa de donación de ovocitos y de profesionales que viajan frecuentemente. Se trata de una herramienta fundamental en reproducción asistida ya que permite optimizar los tratamientos y preservar la fertilidad en pacientes que, potencialmente, pueden perderla (Di Santo *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2012).

En general no existen criterios de selección de muestras para congelación, excepto en el caso de los donantes de semen (que deben cumplir los criterios establecidos por la OMS, Tabla 1); no hay parámetros espermáticos de análisis inicial que permitan una correlación positiva con la supervivencia espermática (López *et al.*, 2012).

Los espermatozoides humanos se caracterizan por presentar bajo contenido en agua por su pequeño tamaño, una matriz viscosa con alto contenido en proteínas y azúcares, y una estructura compartimentalizada; los movimientos de agua y de solutos a través de la membrana del espermatozoide vienen determinadas por el tamaño celular y su permeabilidad. Las dificultades de la congelación derivan de los procesos de enfriamiento y calentamiento, y no de la permanencia a bajas temperaturas, puesto que a estas no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo reacciones químicas (Jiménez *et al.*, 2011; López *et al.*, 2012).

El parámetro crítico en cualquier protocolo de congelación de semen es la velocidad de enfriamiento; el proceso de congelación afecta a la calidad espermática a distintos niveles estructurales y funcionales. El descenso de la temperatura de 37°C a 0°C produce shock por frío y daño por enfriamiento. En esta fase se produce alteración de la bicapa lipídica con aumento de la permeabilidad de solutos a su través. El descenso de 0°C a temperaturas inferiores a -132°C (es decir, por debajo de la temperatura de transición vítrea del agua, en la cual una vez está superenfriada entra en el estado "cristal" y empieza a formar una red cristalina incluso dentro del estado congelado; considerada por ello la temperatura crítica) origina la formación de cristales de hielo, que actúan como lanzas destruyendo los orgánulos y membranas celulares espermáticas; durante el descenso se produce salida de agua del medio intracelular al extracelular produciendo deshidratación del espermatozoide. Para minimizar los efectos nocivos del choque térmico es necesario utilizar medios de congelación (constituidos por componentes ácidos, básicos y nutrientes que aportan energía a las células espermáticas, debiendo ser, además, soluciones isosmóticas con el

plasma seminal, de semejante fuerza iónica, capacidad tampón y un pH cercano a la neutralidad) compuestos por agentes crioprotectores, tampones, siendo los más utilizados el TRIS (tris (hidroximetil) amino metano), el HEPES (ácido 4-(2 hidroxietil)-1-piperacil-etanosulfónico) o el TES (ácido N-tris(hidroxi-metil)metil-2-aminoetanosulfónico); agentes quelantes que disminuyen el gradiente de concentración de iones calcio a través de la membrana plasmática, como el EDTA y el citrato; moléculas estabilizantes de la membrana plasmática, siendo la albúmina o la lecitina las más empleadas actualmente, y una velocidad de enfriamiento adecuada al tipo celular. Las células poseen una velocidad de enfriamiento óptima donde los daños producidos son mínimos, a velocidades de enfriamiento lentas se produce daño celular por deshidratación debida a la elevada concentración de solutos en el medio extracelular, mientras que a velocidades de enfriamiento elevadas el daño es producido por la formación de hielo intracelular. Además, al utilizar soluciones de congelación, la existencia de solutos en el agua disminuye el punto de congelación produciéndose la cristalización del agua a temperaturas menores a la del punto de congelación del agua pura (0°C) (Mazur, 1984; Jiménez *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2012).

Los crioprotectores (CPA) son sustancias hidrosolubles de baja citotoxicidad que evitan o disminuyen la formación de cristales de hielo al bajar la temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido. Pueden ser de dos tipos: penetrantes o no penetrantes, siendo los primeros los más utilizados. Los penetrantes son aquellos que entran en las células y desplazan el agua que hay en ellas ocupando su lugar, evitando así la formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación lenta. Entre ellos encontramos el glicerol, el metanol, el dimetilsulfóxido, el etilenglicol, etc. Los no penetrantes son sustancias de alto peso molecular que actúan rodeando la membrana plasmática, inducen la formación de cristales alrededor de esta, protegiendo así a la célula, y favorecen la deshidratación gracias a la creación de un gradiente osmótico. En este grupo se incluyen azúcares (glucosa y sacarosa), lipoproteínas de la yema de huevo y proteínas de alto peso molecular (Jiménez *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2012).

Los efectos beneficiosos de los CPA se deben a que diluyen la concentración de electrolitos en la solución, limitando su citotoxicidad; disminuyen la concentración de agua, evitando la formación de hielo intracelular; producen un aumento de la viscosidad, que disminuye la movilidad de las moléculas y la formación de cristales; y descienden el punto crioscópico de la solución, al añadir CPA se necesita una temperatura más baja para el cambio de fase, disminuyendo el estrés osmótico que sufren las células (Jiménez *et al.*, 2011).

Los principales efectos adversos de los crioprotectores aparecen al ser utilizados en altas concentraciones, como son la toxicidad y el estrés osmótico. La osmolaridad del medio se ve

aumentada con su adición, los cambios en el volumen del espermatozoide (contracción e hinchazón) pueden causarle un daño irreversible. Pueden resultar tóxicos en las células cuando se añaden o se retiran de la muestra criopreservada; por variaciones bruscas en el volumen celular (al situar células en una solución sin crioprotector, hiposmótica, que podría provocar su rotura) o por daño bioquímico directo (por ejemplo al unirse los CPA a proteínas u orgánulos) (Arakawa *et al.*, 1990; Jiménez *et al.*, 2011).

Las muestras pueden sufrir alteraciones durante el periodo de almacenamiento, que se pueden traducir en una supervivencia nula después de la descongelación. Por esto las muestras deben conservarse en recipientes adecuados para mantenerlas en las mejores condiciones posibles, como pajuelas o criotubos (Jiménez *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2012).

El tiempo que pueden permanecer almacenados los espermatozoides a bajas temperaturas no está claramente definido, se sabe que los tejidos criopreservados pueden permanecer 10 años sin que su viabilidad se altere de manera significativa. Hay casos de fecundación *in vitro* con éxito utilizando espermatozoides almacenados con más de 20 años, pero de manera general no se sabe cuál es el tiempo máximo que pueden estar almacenados preservando su movilidad. Los estándares de la Asociación Española de Bancos de Tejidos (AEBT) dicen que 15 años, o incluso más, entre -140 y -196°C (AEBT, 2008).

Durante la descongelación se producen cambios osmóticos inversos a los de la congelación que es necesario tener en cuenta para obtener muestras en las mejores condiciones (Jiménez *et al.*, 2011).

Criopreservación en pacientes oncológicos

En la actualidad, los nuevos tratamientos quimioterapéuticos junto con la radioterapia han conseguido aumentar de manera considerable la supervivencia de pacientes afectados de cáncer, especialmente entre los pacientes jóvenes; pero uno de los mayores inconvenientes de estos tratamientos es la pérdida de la capacidad reproductora en el futuro. Por esto es cada vez más frecuente intentar conseguir una mayor calidad de vida para estas personas. No se trata ya de conservar la vida, sino de que la calidad de ésta sea lo más cercana posible a la normalidad, siendo uno de los aspectos más determinantes la preservación de la fertilidad (Trottmann *et al.*, 2007; Callejo *et al.*, 2013).

En el caso concreto de los varones la posibilidad de que exista disfunción gonadal depende de varios factores:

- Si a la quimioterapia se añade tratamiento radioterápico el riesgo de infertilidad aumenta en más de un 75%.
- Hay tratamientos quimioterapéuticos que van a tener un mayor efecto negativo sobre la función testicular que otros.
- En ciertos tumores puede existir una mayor afectación testicular en el momento del diagnóstico que en otros. Los cánceres que tienen un efecto más negativo en la esterilidad son las leucemias mieloides, el cáncer de testículo, y la leucemia linfocítica (Degl'Innocenti *et al.*, 2013; Hotaling *et al.*, 2013).

Para poder saber si hay recuperación gonadal o no al menos hay que realizar un espermiograma entre 6 meses y un año tras haber finalizado el tratamiento. Hay pacientes que tardan años en dicha recuperación. Una media del 15% al 30% de pacientes varones curados de la enfermedad de Hodgkin permanecen azoospermicos varios años después. De manera global, alrededor de un 70% de los pacientes con algún tipo de tumor van a recuperar total o parcialmente dicha función (Trottman *et al.*, 2007; Callejo *et al.*, 2013).

La criopreservación de semen es actualmente la única alternativa para preservar el potencial reproductivo en varones que sufren tratamientos potencialmente esterilizantes. Debe ofrecerse a todos los pacientes diagnosticados de cáncer tan pronto como sea posible y antes de iniciar cualquier tratamiento, quimioterapia o radioterapia (Trottman *et al.*, 2007; Callejo *et al.*, 2013).

En un primer análisis de la muestra obtenida para conocer la cantidad de espermatozoides, movilidad y de qué tipo, se observa ya una disminución del número de espermatozoides y de su movilidad en un porcentaje importante de pacientes (Trottmann *et al.*, 2007).

Como ya hemos visto las bajas temperaturas son el mejor método para que los espermatozoides almacenados mantengan su viabilidad, pero se sabe que alrededor de un 50% de ellos no van a sobrevivir una vez descongelados. Partiendo de que la calidad de las muestras de semen de pacientes que van a seguir tratamientos oncológicos suele ser baja, la mejor opción terapéutica es la fecundación *in vitro* con inyección intracitoplasmática de espermatozoides (FIV-ICSI); por ello es importante realizar el llamado test post-descongelación para valorar si la muestra almacenada es válida para realizar esta técnica (Trottman *et al.*, 2007; Degl'Innocenti *et al.*, 2013).

Proceso de congelación

En una primera fase de preparación, tras la recogida de la muestra, y cuando la licuefacción de esta ya es completa, se realiza un análisis básico. También existe la posibilidad de congelar muestras testiculares/epididimarias, procedentes de la disección del tejido testicular o el aspirado epididimario; y espermatozoides recuperados, previamente seleccionados (en este caso la selección se realiza por técnicas de capacitación espermática: gradientes de densidad, *swim-up*) (Jiménez *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2012).

La segunda fase se corresponde con la adición del medio de criopreservación, este se añade tras ser previamente atemperado, en la proporción correspondiente según su composición y en la cantidad requerida por el volumen de la muestra. Dicha adición debe ser muy cuidadosa y realizarse muy lentamente, gota a gota y homogeneizando suavemente la mezcla, para así evitar someter a choque osmótico a las células espermáticas. La solución se deja equilibrar en un periodo de entre 10 minutos y 1 hora como máximo, antes de proceder a la congelación. Este tiempo de espera puede emplearse en la identificación de los recipientes donde se conservará la muestra de semen (Jiménez *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2012).

Dos de los medios más empleados son SpermCryo™All-round (Cryos International) y CryoSperm™ (Origio). El primero está compuesto por HEPES, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, hidrogenofosfato de sodio, carbonato sódico, lactato de calcio, sacarosa, glucosa, glicina, cloruro de sodio, glicerol y albúmina de suero humana (HSA); sus principales características es que no contiene albúmina de huevo ni antibióticos, como CPA penetrante tiene el glicerol y como no penetrantes sacarosa y glucosa. El segundo por HEPES, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, sulfato de gentamicina, glucosa, glutamina, cloruro de sodio, glicerol, glicina, agua Milli-RX, rafinosa, bicarbonato sódico, L-lactato de sodio, fosfato sódico, piruvato sódico y taurina; se caracteriza por no contener HSA y usar una mezcla de glicerol (CPA penetrante) y rafinosa (CPA no penetrante, al igual que la glucosa) como crioprotectores (Paras *et al.*, 2008; Origio; 2010; Cryos International, 2014).

La siguiente fase se corresponde con la congelación de la solución de criopreservación, dónde las técnicas más empleadas son:

- Congelación de forma programada o congelación en rampa. En este caso el volumen de la muestra es distribuido entre varios recipientes para posteriormente introducirlos en un congelador biológico programable y comenzar el ciclo de congelación. Un ejemplo de curva genérica de congelación sería el siguiente (Jiménez *et al.*, 2011):

- Etapa 1: Reducción de la temperatura desde la temperatura ambiente a 4°C con una velocidad moderada de enfriamiento de -5°C/min. El espermatozoide se deshidrata en un tiempo muy limitado.
 - Etapa 2: Reducción de la temperatura desde 4°C a -80°C a una velocidad rápida de -10°C/min. La solución de espermatozoides comienza a solidificarse.
 - Etapa 3: Reducción de la temperatura de -80°C a -160°C tan rápidamente como permita el sistema de congelación. El protocolo de congelación debe congelar a una temperatura inferior a -160°C para minimizar el riesgo de daño por recristalización durante la transferencia desde el congelador al lugar de almacenamiento.
 - Etapa 4: Reducción de la temperatura de -160°C a -196°C sumergiendo los recipientes en nitrógeno líquido rápidamente.
- Congelación en perlas o píldoras. Para ello se excavan unos pequeños pocillos sobre nieve carbónica sobre los que se van depositando pequeñas cantidades de solución de criopreservación. Se obtienen, mediante esta técnica, gotas de dicha solución congeladas, que se depositarán dentro de un criotubo previamente enfriado.

El almacenamiento en ambos casos se realiza en tanques de nitrógeno líquido, donde se almacenarán hasta el momento de su uso (Lim *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2012).

Proceso de descongelación

Los métodos de descongelación más utilizados son la descongelación lenta (a temperatura ambiente: 10-20°C/min) y la rápida (a 37°C: 400°C/min), aunque la más utilizada es la descongelación lenta. Una vez está la muestra descongelada, se separa del medio de criopreservación mediante lavado con medio de cultivo y centrifugación (Sánchez *et al.*, 2009; Di Santo *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2012).

2. OBJETIVOS

En vista de la importancia de optimizar la técnica de criopreservación, en cuanto a viabilidad y supervivencia de los espermatozoides a este proceso, y con ello obtener espermatozoides en número y con movilidad suficiente para poder ser utilizados en reproducción asistida, realizamos un experimento con el objetivo de contestar a las siguientes preguntas:

- (I) ¿Existe un efecto del tiempo de espera para el procesado de la muestra sobre la movilidad de los espermatozoides? Se espera que cuanto mayor sea el tiempo que transcurra entre el eyaculado y el procesado de la muestra menor movilidad mostrarán los espermatozoides.
- (II) ¿Existen diferencias en la movilidad tras un proceso de congelación-descongelación entre una misma muestra tratada con dos medios de criopreservación diferentes, SpermCryo™All-round (Cryos International) y CryoSperm™ (Origio)? Se espera una mayor movilidad en las muestras en las que se ha empleado CryoSperm™, en base a los mejores resultados que se están obteniendo en el Maternidad HM Belén en los procesos de criopreservación seminal.
- (III) ¿Existe una mayor movilidad post-descongelación en muestras sometidas a un baño de nitrógeno líquido previo a su almacenamiento en los tanques de nitrógeno líquido que en aquellas en las que no se realiza dicho paso? Se espera una mayor movilidad en las muestras expuestas a un baño de nitrógeno líquido previo a su almacenamiento, en base a los mejores resultados que se están obteniendo en el Maternidad HM Belén en los procesos de criopreservación seminal introduciendo este paso en el protocolo de congelación.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material

Se utilizaron un total de 13 muestras de semen de diferentes pacientes procedentes del laboratorio general del CHUAC. Dichos pacientes se encontraban en estudio por problemas de la fertilidad de la pareja (PFP), los cuales acuden a la consulta del ginecólogo/urólogo debido a la incapacidad de concebir un hijo tras un período de un año.

Dichas muestras son recogidas por el laboratorio general dentro del tiempo recomendado (inferior a 1 hora entre el eyaculado y la recepción de la muestra) y se someten a un análisis en el Sperm Class Analyzer® (ver apartado: “Proceso de criopreservación de las muestras”), entre otras pruebas. Del total del volumen del eyaculado restante (tras las pruebas realizadas por el laboratorio general) se usó para llevar a cabo este estudio un volumen superior a 1 mL en todos los casos, además se nos proporcionó una copia de los resultados de este SCA (al que se hará referencia como 1^{er} SCA).

3.2 Diseño experimental

El diseño experimental consistió en la congelación de cada una de estas muestras con dos medios de criopreservación, SpermCryo™All-round (Cryos International, Aarhus, Dinamarca) y CryoSperm™ (Origio, Malov, Dinamarca), y para cada solución de criopreservación la mitad de los criotubos se sometió a un baño en nitrógeno líquido (Figura 3). El total de los criotubos fue almacenado a bajas temperaturas en tanques de nitrógeno líquido, en la fase gas del nitrógeno (a unos -150°C), durante al menos 1 semana. Posteriormente se verificó la criosupervivencia mediante la valoración de la movilidad post-descongelación.

Dicho ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fecundación *in vitro* y en la Unidad de Criobiología-Banco de Tejidos del Hospital Teresa Herrera (CHUAC).

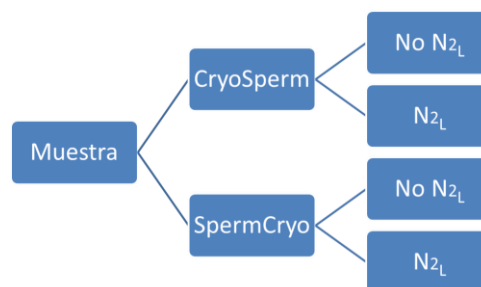


Figura 3. Esquema ilustrativo de la división de la muestra para su congelación.

3.3 Proceso de criopreservación de las muestras

En primer lugar se llevó a cabo un análisis inicial mediante el analizador automático Sperm Class Analyzer® 5.2 (MICROPTIC S.L., Barcelona, España) (al que se hará referencia como SCA FIV). El Sperm Class Analyzer® (SCA®) es un sistema CASA (*Computer Aided Semen Analysis*), que permite realizar un análisis automático y objetivo de la concentración y movilidad, entre otras, del semen humano, siguiendo las indicaciones y criterios establecidos por la OMS.

Con la ayuda de una pipeta se mide el volumen de la muestra, a continuación se cargan 0.2µL de semen en un portaobjetos con recipientes de conteo de 10 micrones de profundidad (Leja®) (Figura 4, b) y se coloca en el microscopio (Figura 4, a) para su análisis; manteniendo la muestra en todo momento a una temperatura de 37°C. Para aquellas muestras con un recuento de espermatozoides móviles igual o superior al 50%, o con un recuento de espermatozoides igual o superior a 3 millones, se procedió a la congelación directa del eyaculado de forma programada (congelación en rampa) y para aquellas con un recuento de espermatozoides móviles inferior al 50%, o con un número de espermatozoides inferior a 3 millones, se capacitó la muestra mediante gradientes y la congelación de la suspensión de espermatozoides se realizó en perlas.

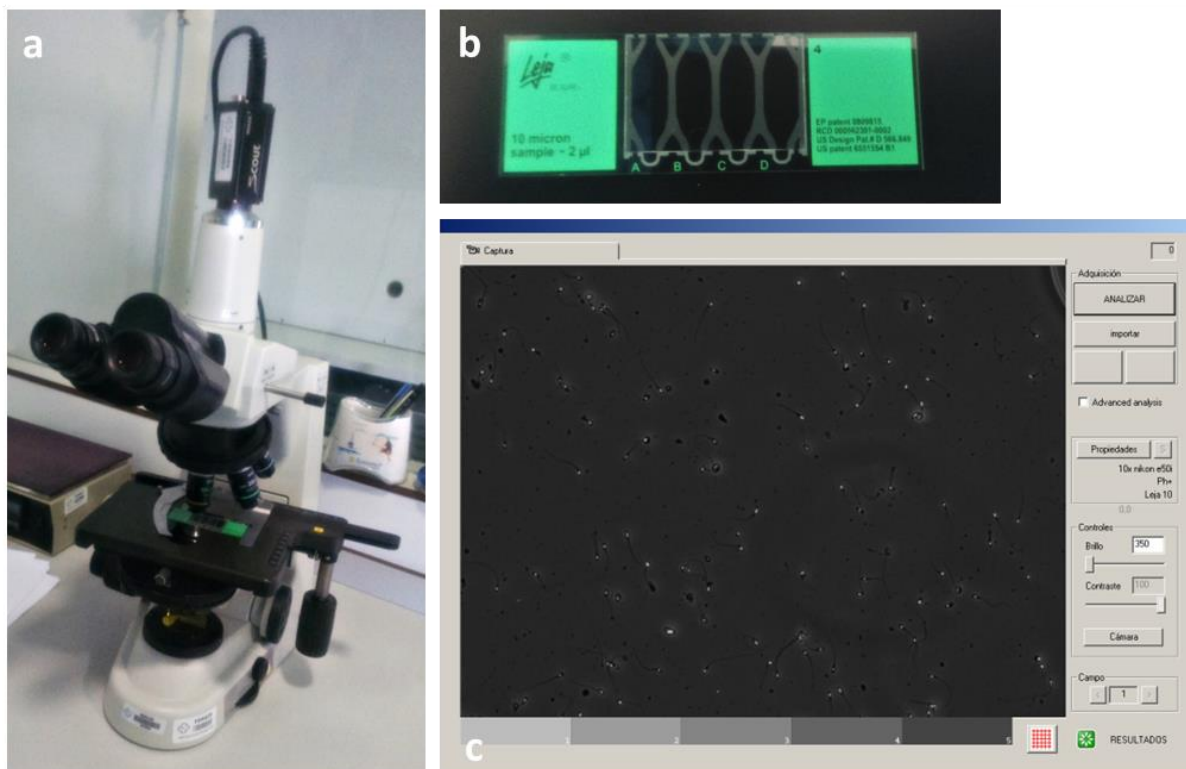


Figura 4. Imagen del microscopio biológico asociado al software SCA® (a), portaobjetos Leja® con cuatro recipientes de 10 micrones de profundidad (b) e imagen de la visualización de un campo de la muestra en el programa (c).

Capacitación mediante gradientes

La finalidad de la capacitación de las muestras de semen es eliminar del eyaculado restos celulares, bacterias, leucocitos, espermatozoides muertos y lentos y las secreciones seminales, y al mismo tiempo seleccionar y concentrar la población de espermatozoides más fértiles (Figura 5).

En un tubo de ensayo de fondo cónico con 0.5 mL de SpermGrad™ (Vitrolife, Barcelona, España) al 90% y 0.5 mL al 45% se adiciona la muestra de semen y se somete a una centrifugación durante 15 min a 1100 rpm, se elimina el sobrenadante y se adiciona 1 mL de G-IVF™ PLUS (Vitrolife) y se realiza una segunda centrifugación a 1100 rpm durante 5 min. Tras esta última centrifugación se elimina el sobrenadante y se adiciona 1 mL de Sequential Fert™ (Origio). Al finalizar la capacitación se realiza un segundo análisis con el SCA® (SCA post-gradientes).

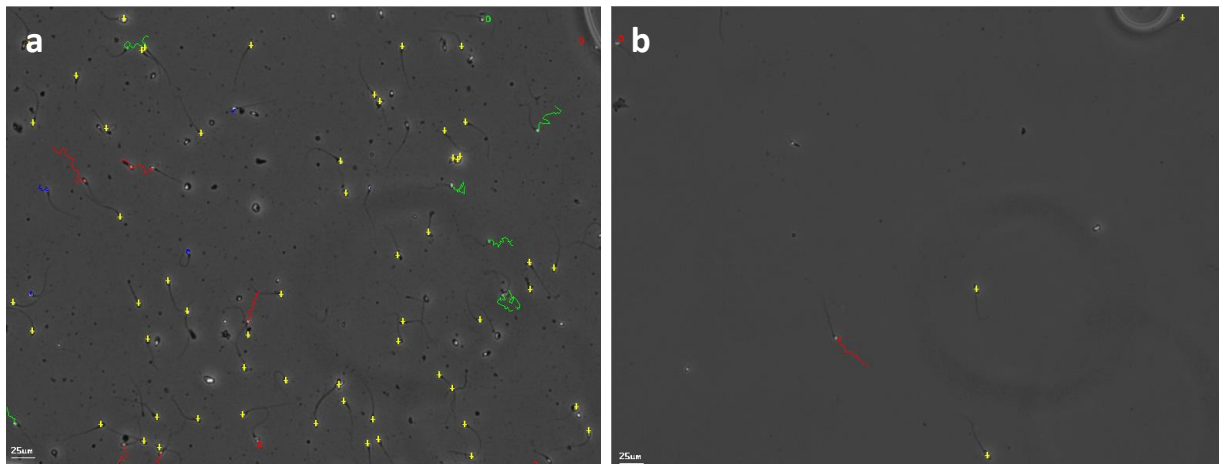


Figura 5. Imágenes correspondientes a un campo del análisis de una muestra con el SCA® antes (a) y después de la capacitación (b). En rojo espermatozoides tipo a, en verde tipo b, en azul tipo c y en amarillo tipo d.

Adición del medio de criopreservación

Se divide el volumen final de la muestra de semen o de la suspensión de espermatozoides en dos tubos. En uno de ellos se añadirá el medio de criopreservación SpermCryo™All-round, en una proporción 1:3, y en el otro CryoSperm™, en una proporción 1:1, como indica el comercial (Figura 6). En ambos casos el medio se añade gota a gota sobre el semen o la suspensión de espermatozoides y la solución se mezcla minuciosamente después de cada adición.

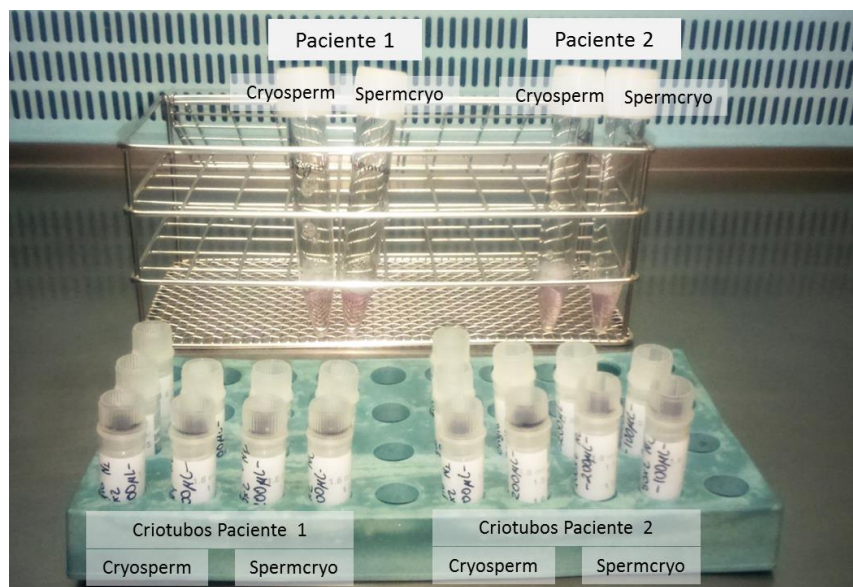


Figura 6. En la parte superior de la imagen se muestran cuatro tubos de fondo cónico, dos correspondientes a la muestra de un paciente y dos a la de otro, a las que ya se ha adicionado el crioprotector. En la parte inferior los criotubos ya rotulados.

La mezcla se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos, pasados estos se procede a la congelación mediante una de las dos técnicas mencionadas con anterioridad.

Congelación en rampa

Se distribuye el semen diluido en criotubos de 1.8 mL (Thermo Fisher Scientific Inc.), con un volumen de 0.8 mL en cada uno de ellos y se procede a la congelación de forma programada utilizando un congelador biológico (CM 2000). El programa de congelación se muestra en la Tabla 2 (en forma de gráfica en la Figura 7), en ella aparecen las diferentes etapas y temperaturas a las que se someten los criotubos y el tiempo que se mantienen en cada una de ellas. Además, dentro del congelador programable se coloca una sonda de temperatura en el interior de un criotubo testigo que contiene medio de congelación (en este caso 3 mL del medio Sperm Wash de Vitrolife). Al finalizar este proceso los criotubos son transportados en vapores de nitrógeno, en el interior de una caja de porexpan con nitrógeno líquido en el fondo, para su almacenamiento en el tanque.

	SEG1	SEG2	SEG3	SEG4	SEG5	SEG6	SEG7	SEG8	SEG9	SEG10
Temp(°C)	10.0	10.0	-2.0	-2.5	-25.0	-34.5	-34.5	-50.0	-120.0	-120.0
Time(m)	0.0	10.0	0.0	2.9	0.5	0.9	2.3	1.9	3.5	10.0

Tabla 2. Programa de congelación en rampa en el congelador biológico CM 2000 para muestras de semen.

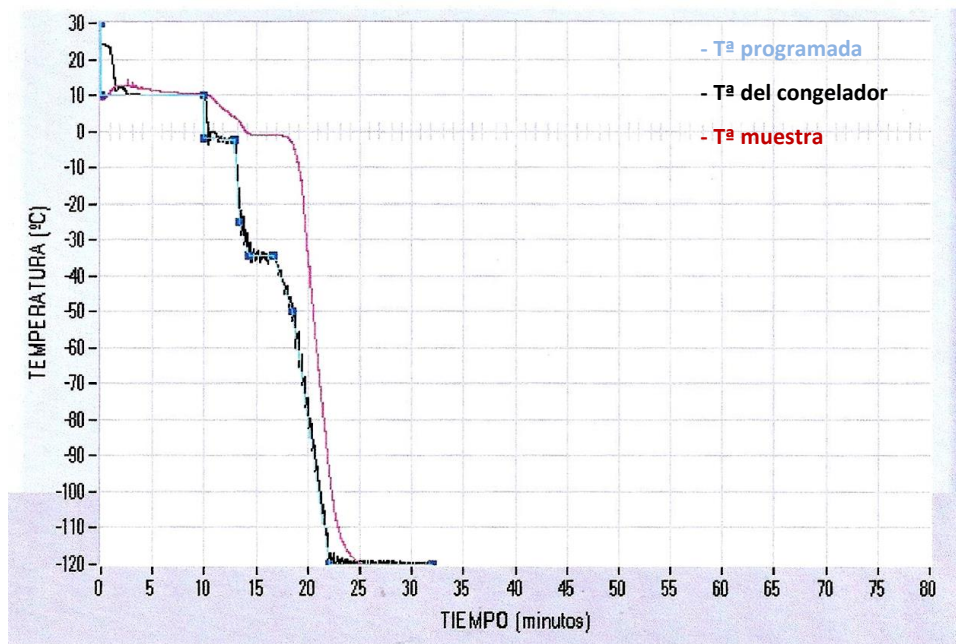


Figura 7. Ejemplo de una gráfica de congelación en rampa en el congelador biológico CM 2000 para muestras de semen.

Congelación en perlas

Se realizan perlas de 50 o 100 μL de la suspensión de espermatozoides diluida con el medio crioprotector. Para ello, con la ayuda de una pipeta, se deja caer una gota de la suspensión sobre un pequeño pocillo realizado sobre nieve carbónica (Figura 8, a). Después de unos minutos se colocan entre 2 y 4 perlas por criotubo (previamente enfriado en la nieve carbónica) para su posterior almacenamiento (Figura 8, b y c).

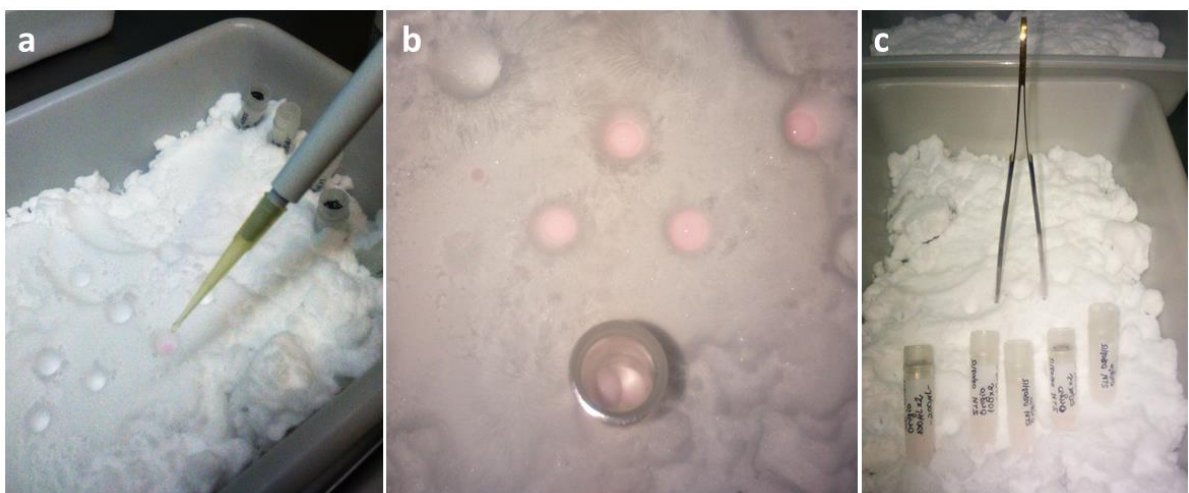


Figura 8. Proceso de congelación en perlas: gota de suspensión sobre el pocillo (a), perlas ya listas para su introducción en el criotubo y detalle de dos perlas en el interior de uno (b) y cinco criotubos con las perlas en su interior (c).

Almacenamiento

Como se ha comentado anteriormente, una parte de los criotubos (la mitad correspondiente a cada crioprotector) se somete a un baño de nitrógeno líquido (Figura 9, a), a continuación se introducirán todos dentro de una caja (Figura 9, b y c) para su almacenamiento en el interior del tanque de nitrógeno líquido, en fase gas y a una temperatura de unos -150°C durante al menos 1 semana (Figura 9, d).

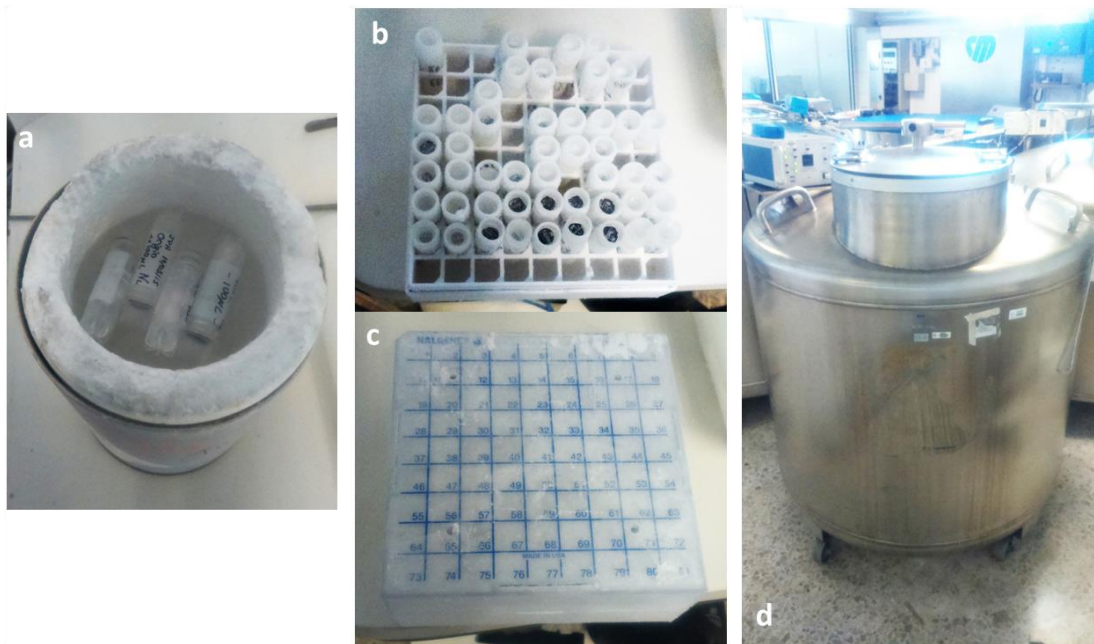


Figura 9. Baño de los criotubos seleccionados en un recipiente con nitrógeno líquido (a), caja para el almacenamiento de los criotubos (b y c) y tanque de nitrógeno líquido (d).

3.4 Proceso de descongelación de las muestras

Para la verificación de la criosupervivencia mediante la valoración de la movilidad post-descongelación con el SCA[®] fue necesaria la descongelación de las muestras siguiendo el siguiente protocolo:

La muestra o alícuota se transfiere a un tubo de ensayo de fondo cónico y se deja descongelar a temperatura ambiente durante 10 minutos; pasado este tiempo se adiciona 1 mL de medio G-IVF[™] PLUS gota a gota y se centrifuga durante 5 min a 1100 rpm; se retira el sobrenadante y se añade un volumen de Sequential Fert[™] igual al volumen de la muestra congelada en el criotubo. Se deja reposar un par de minutos y se realiza la valoración mediante un análisis en el SCA[®].

3.5 Variables a estudio

Para cada una de las 13 muestras se recogieron, de manera individual, los siguientes datos: hora de eyaculado, hora de recepción de la muestra (por el laboratorio general del CHUAC), hora del SCA del laboratorio general y edad del paciente, junto a una copia de este primer SCA. Se anotó la hora de realización del SCA de FIV junto a los resultados de este; para aquellas muestras que fueron procesadas por perlas también los datos del SCA post-gradientes.

Por último también fueron evaluados en este estudio los resultados de los test post-descongelación (SCA post-descongelación), realizados sobre 12 de las 13 muestras. Para cada una de ellas se descongelaron 4 alícuotas, en función del crioprotector empleado y de si se realizó o no el baño en nitrógeno líquido:

- CryoSperm™:
 - Alícuota no sometida a baño de nitrógeno líquido.
 - Alícuota sometida a baño de nitrógeno líquido.
- SpermCryo™All-round:
 - Alícuota no sometida a baño de nitrógeno líquido.
 - Alícuota sometida a baño de nitrógeno líquido.

Los parámetros obtenidos de los análisis en el SCA® fueron la concentración y los porcentajes de espermatozoides móviles, móviles progresivos, móviles no progresivos e inmóviles.

3.6 Tratamiento estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables recogidas. Para analizar las variaciones en los parámetros estudiados en los diferentes pasos del proceso experimental se utilizó el test de los rangos con signo de Wilcoxon. Se analizó la asociación entre el tiempo transcurrido desde el SCA del laboratorio general (1^{er} SCA) al SCA de FIV (SCA FIV) y las variaciones en la movilidad de los espermatozoides utilizando el coeficiente de correlación Rho de Spearman. Se analizó la diferencia en los parámetros estudiados según el medio de criopreservación y el uso o no de nitrógeno líquido mediante el test U de Mann-Whitney y el test de Kruskal-Wallis.

El nivel de significación aceptado fue *p-valor* < 0.05. Los datos fueron analizados con el programa estadístico IBM SPSS Statistic 19.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EEUU).

4. RESULTADOS

La edad de los pacientes osciló entre los 30 y los 49 años, con una media de 38.15 ± 4.77 años y una mediana de 37 años (Figura 10).

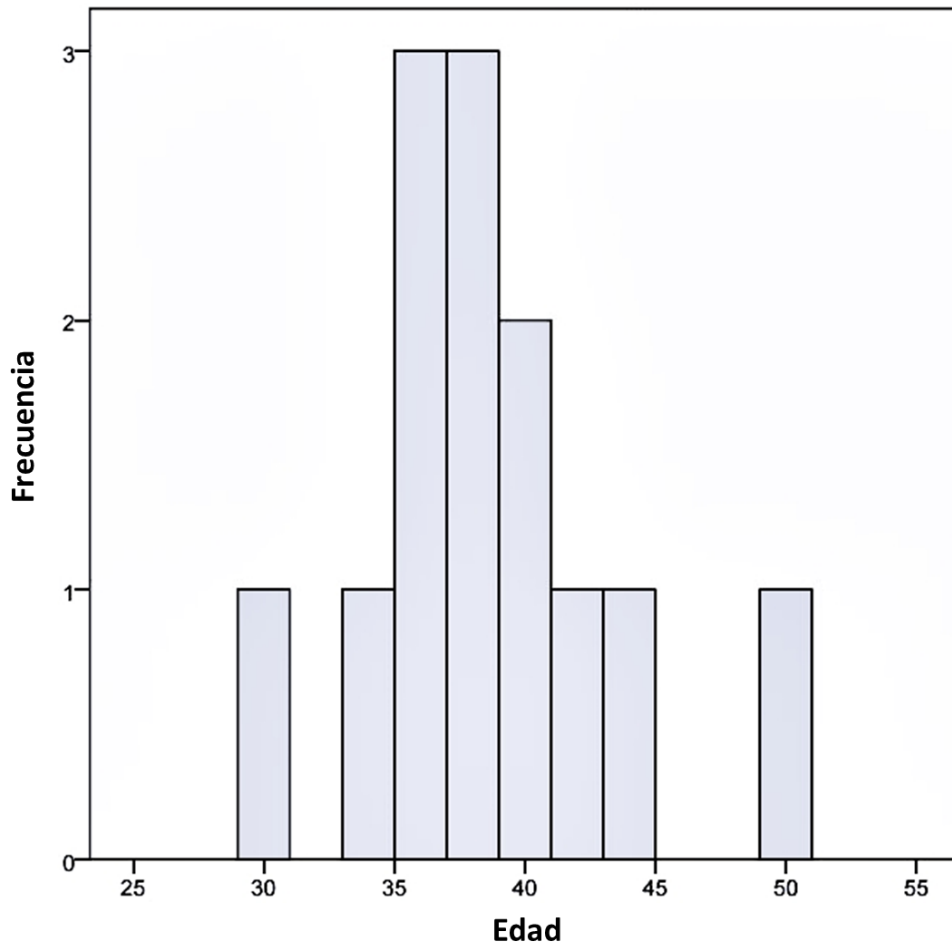


Figura 10. Histograma de frecuencias de la edad de los pacientes.

El tiempo transcurrido entre el eyaculado y la recepción de la muestra se encontró en todos los casos por debajo del tiempo máximo recomendado por la OMS (60 min), con una mediana de aproximadamente 30 min. Siendo el tiempo transcurrido desde el eyaculado hasta el SCA del laboratorio general de unos 40 min (Tabla 3).

	Media (DT)	Mediana	Mínimo	Máximo
TIEMPO (min) DESDE EL EYACULADO HASTA SU RECEPCIÓN	29.2 (17.8)	30.5	5.0	55.0
TIEMPO (min) DESDE EL EYACULADO HASTA EL 1^{er} SCA	39.3 (17.9)	40.5	15.0	65.0
TIEMPO (min) DESDE LA RECEPCIÓN HASTA EL 1^{er} SCA	10.6 (1.9)	10.0	10.0	17.0

Tabla 3. Media y desviación típica (DT), mediana, mínimo y máximo del tiempo transcurrido entre el eyaculado y la recepción de la muestra, eyaculado y realización del 1^{er} SCA y recepción de la muestra y 1^{er} SCA.

Los resultados del análisis de los datos del 1^{er} SCA realizado por el laboratorio general (dentro del tiempo recomendado por la OMS como hemos visto) muestran una media y una mediana en la concentración de espermatozoides (en millones/mL) superior al valor límite inferior de referencia de la OMS (14.9 millones/mL), con valores que van desde los 0.5 hasta los 94 millones/mL. En cuanto a la concentración de espermatozoides en el total de la muestra los valores se mueven entre los 2.5 hasta los 469 millones/muestra, con una media y una mediana, también para este parámetro, superior al valor de referencia de la OMS (39 millones/eyaculado). Es el caso también del porcentaje de espermatozoides móviles (tipo a, tipo b y tipo c) que varía entre el 22 y el 84% (siendo en la mayoría de los casos inferior al 50%); pero la media de los valores, y su mediana, superan el 40% (valor de referencia de la OMS). El porcentaje de espermatozoides progresivos (resultado de la suma del porcentaje de espermatozoides tipo a y tipo b) oscila en torno al 30%; para este parámetro los valores extremos fueron un mínimo del 6% y un máximo del 84%. Por último, los no progresivos (que se corresponden a los espermatozoides tipo c) tuvieron una mediana del 18% (Tabla 4).

	Media (DT)	Mediana	Mínimo	Máximo
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/mL)	38.4 (31.4)	31.4	0.5	94.0
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/muestra)	178.6 (148.9)	154.2	2.5	469.0
% MÓVILES	47.5 (16.9)	48.0	22.0	84.0
% PROGRESIVOS	29.6 (13.1)	33.5	6.0	49.0
% NO PROGRESIVOS	17.9 (6.7)	18.0	9.0	35.0

Tabla 4. Media y desviación típica (DT), mediana, mínimo y máximo de los resultados de los parámetros medidos en los SCA's realizados por el laboratorio general.

El tiempo mínimo transcurrido entre la recepción de la muestra por el laboratorio general y la realización del SCA de FIV fue de 83 min y el máximo de 188 min, con una media de 153.2 ± 29.6 min y una mediana de 162 min, aproximándose por lo tanto a las 3 horas y excediendo considerablemente el tiempo recomendado por la OMS. El tiempo entre los dos SCA's (laboratorio y FIV) fue de 10 minutos menos, con respecto a los valores anteriores (Tiempo desde la recepción hasta el SCA de FIV) (Tabla 5).

	Media (DT)	Mediana	Mínimo	Máximo
TIEMPO (min) DESDE LA RECEPCIÓN DE LA MUESTRA HASTA EL SCA DE FIV	153.2 (29.6)	162.0	83.0	188.0
TIEMPO (min) DESDE EL 1^{er} SCA AL SCA DE FIV	142.6 (30.3)	152.0	73.0	178.0

Tabla 5. Media y desviación típica (DT), mediana, mínimo y máximo del tiempo transcurrido entre la recepción de la muestra o el 1^{er} SCA y el SCA de FIV.

En la siguiente tabla (Tabla 6) se muestran los resultados de los parámetros medidos en los SCA's realizados en el laboratorio de FIV (SCA's FIV). Como se comentó el volumen de muestra utilizado fue en todos los casos superior a 1 mL (mínimo de 1.1 mL). El volumen máximo utilizado fue de 2.9 mL; la media de 1.8 ± 0.7 mL y la mediana de 1.4 mL.

	Media (DT)	Mediana	Mínimo	Máximo
VOLUMEN MUESTRA (mL)	1.8 (0.7)	1.4	1.1	2.9
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/mL)	39.2 (31.6)	27.4	1.2	99.0
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/muestra)	75.0 (84.6)	48.3	1.7	287.1
% MÓVILES	34.1 (18.1)	34.4	7.2	67.6
% PROGRESIVOS	22.7 (15.5)	23.0	2.5	52.4
% NO PROGRESIVOS	11.5 (5.2)	12.2	4.1	21.5

Tabla 6. Media y desviación típica (DT), mediana, mínimo y máximo de los resultados de los parámetros medidos en los SCA's realizados en el laboratorio de FIV.

Comparando algunos de los valores del SCA de FIV con los criterios de la OMS (Tabla 7) se observa que el requisito que no cumplen la mayoría de las muestras es presentar un porcentaje de espermatozoides móviles superior al 40%. En nuestro estudio el valor establecido (para decidir el

procesado) fue un recuento de espermatozoides móviles igual o superior al 50%, o un recuento de espermatozoides igual o superior a 3 millones.

		%
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/mL)	> 14.9	76.9
% MÓVILES	> 40	30.8
% PROGRESIVOS	> 31.9	53.8

Tabla 7. Comparación con los criterios de la OMS. %: porcentaje equivalente de muestras que superan el valor límite de referencia.

Se descartaron diferencias significativas en la concentración de espermatozoides entre el SCA del laboratorio general y el SCA de FIV (Tabla 8; el signo “-” indica que se trata de un aumento porcentual).

Hay cambios significativos en el porcentaje de espermatozoides móviles, no progresivos e inmóviles, pero no se observan cambios significativos en el porcentaje de espermatozoides progresivos, aunque es inferior en el SCA de FIV (Tabla 9). Es un 27% inferior la cantidad de espermatozoides móviles en el SCA de FIV con respecto al SCA inicial, los cuales se van acumulando en los no progresivos, y los no progresivos en los inmóviles, es por esto que el porcentaje de espermatozoides inmóviles aumenta en cerca de un 20%.

	SCA LABORATORIO GRAL		SCA FIV		DESCENSO PORCENTUAL		P
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/mL)	38.4 (31.4)	31.5	39.2 (31.6)	27.4	-21.6 (59.5)	-5.3	0.861

Tabla 8. Diferencias en la concentración de espermatozoides entre el SCA del laboratorio general y el SCA de FIV. Las diferencias significativas (p -valor < 0.05) se destacan con el símbolo “*”.

	SCA LABORATORIO GRAL		SCA FIV		DESCENSO PORCENTUAL		P
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	
% MÓVILES	47.5 (16.9)	48.0	34.1 (18.1)	34.4	26.4 (33.2)	27.0	0.012*
% PROGRESIVOS	29.6 (13.1)	33.5	22.7 (15.5)	23.0	17.6 (41.3)	18.4	0.136
% NO PROGRESIVOS	17.9 (6.7)	18.0	11.5 (5.2)	12.2	31.8 (36.9)	39.9	0.023*
% INMÓVILES	5.5 (16.9)	52	65.87 (18.1)	65.6	-30.7 (35.0)	-19.6	0.012*

Tabla 9. Diferencias en el porcentaje de espermatozoides móviles, progresivos, no progresivos e inmóviles, entre el SCA del laboratorio general y el SCA de FIV. Las diferencias significativas (p -valor < 0.05) se destacan con el símbolo “*”.

A mayor tiempo transcurrido entre el SCA inicial, del laboratorio general, y el SCA de FIV se observan variaciones en el porcentaje de espermatozoides móviles, no progresivos (que presenta la asociación más alta $\rho=0.539$) e inmóviles; aunque ninguna de estas asociaciones es significativa (Tabla 10).

		% MÓVILES	% PROGRESIVOS	% NO PROGRESIVOS	% INMÓVILES
TIEMPO (min) DESDE EL	Rho (ρ)	0.238	-0.154	0.539	0.354
1 ^{er} SCA AL SCA DE FIV	<i>p</i>	0.456	0.632	0.070	0.259

Tabla 10. Asociación entre el tiempo transcurrido desde el SCA del laboratorio general (1^{er} SCA) al SCA de FIV (SCA FIV) y las variaciones en la movilidad de los espermatozoides. Las asociaciones significativas (p -valor < 0.05) se destacan con el símbolo “*”.

Del total de las muestras, dos de ellas (15.4%) se congelaron empleando la congelación programada (congelación en rampa) y las once restantes (84.6%) en perlas. En los resultados de frecuencias del SCA de FIV para estos dos grupos (Tabla 11) se observa que las muestras que fueron procesadas por perlas eran peores, como cabía esperar; la concentración de espermatozoides (en millones/mL) fue mucho menor, al igual que el porcentaje de espermatozoides móviles (32.2% respecto al 66.4%) y progresivos. Las medianas no difieren tanto en cuanto al porcentaje de espermatozoides no progresivos, pero sí lo hacen en el porcentaje de espermatozoides inmóviles, ya que para las muestras que se procesaron por perlas fue aproximadamente del 70% y para las de rampa cerca de la mitad.

	RAMPA (N=2)		PERLAS (N=11)	
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/mL)				
% MÓVILES	66.4 (1.6)	66.4	28.3 (12.0)	32.2
% PROGRESIVOS	50.3 (3.0)	50.3	17.6 (10.3)	22.8
% NO PROGRESIVOS	16.1 (1.3)	16.1	10.6 (5.2)	11.3
% INMÓVILES	33.6 (1.6)	33.6	71.8 (12.0)	67.8

Tabla 11. Media con desviación típica (DT) y mediana de los resultados de los parámetros medidos en los SCA's realizados en el laboratorio de FIV en función del proceso de congelación al que se sometieron posteriormente las muestras (rampa o perlas).

El SCA post-gradientes realizado a las 11 muestras que se capacitaron, destinadas a la congelación en perlas, mostró las mejoras esperadas tras la aplicación de dicha técnica con respecto

al SCA de FIV (Tabla 12). Las diferencias fueron significativas para la concentración de espermatozoides (medida en millones/mL), que mostró un descenso de un 90%; para el porcentaje de espermatozoides móviles, cuya cantidad aumentó en un 70%; para la cantidad de espermatozoides progresivos que se duplicó; y para el porcentaje de inmóviles que descendió en un 40% con respecto al SCA anterior.

	SCA FIV		SCA POST-GRADIENTES		DESCENSO PORCENTUAL		P
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/mL)	30.3 (24.6)	24.1	2.7 (2.6)	1.8	87.3 (10.4)	92.2	0.003*
% MÓVILES	28.3 (12.0)	32.2	53.5 (24.4)	62.5	-106.1 (102.0)	-70.4	0.003*
% PROGRESIVOS	17.6 (10.3)	22.8	42.9 (23.7)	46.2	-211.8 (216.4)	-129.4	0.008*
% NO PROGRESIVOS	10.6 (5.2)	11.3	10.6 (5.7)	11.1	-24.4 (101.7)	2.0	0.999
% INMÓVILES	71.8 (12.0)	67.8	46.5 (24.4)	37.5	36.6 (28.4)	40.8	0.003*

Tabla 12. Diferencias en concentración de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides móviles, progresivos, no progresivos e inmóviles, entre el SCA de FIV y el SCA post-gradientes para aquellas muestras que fueron congeladas en perlas (N=11). Las diferencias significativas (*p*-valor < 0.05) se destacan con el símbolo “*”.

El uso de un medio crioprotector u otro no mostró diferencias significativas en los resultados de movilidad post-descongelación (Tabla 13). Aunque las diferencias entre ambos no fueron significativas, el porcentaje de espermatozoides móviles y progresivos fue mayor en las muestras en las que se utilizó CryoSperm™.

	CRYOSPERM (Origio) (N=24)		SPERMCRYO (Cryos) (N=24)		P
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/mL)	5.5 (10.1)	1.0	5.7 (11.1)	1.3	0.317
% MÓVILES	26.5 (15.1)	27.5	20.6 (13.2)	19.9	0.135
% PROGRESIVOS	16.3 (11.8)	17.8	10.4 (9.0)	9.7	0.086
% NO PROGRESIVOS	10.2 (5.5)	11.2	10.2 (5.8)	9.9	0.085

Tabla 13. Diferencias en los resultados de los SCA's post-descongelación en función del medio crioprotector empleado (CryoSperm™ o SpermCryo™ All-round). Las diferencias significativas (*p*-valor < 0.05) se destacan con el símbolo “*”.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la aplicación de un baño de nitrógeno o no a los criotubos antes de su almacenamiento (Tabla 14).

	NO N ₂ L (N=24)		N ₂ L (N=24)		P
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/mL)	6.1 (11.7)	1.2	5.0 (9.4)	1.1	0.926
% MÓVILES	23.0 (14.0)	25.2	24.1 (14.9)	25.8	0.877
% PROGRESIVOS	12.7 (11.1)	10.3	14.1 (10.7)	13.2	0.591
% NO PROGRESIVOS	10.3 (5.4)	10.9	10.1 (5.9)	9.9	0.726

Tabla 14. Diferencias en los resultados de los SCA's post-descongelación en función de si las alícuotas se sometieron a un baño de nitrógeno líquido (N₂L) o no (NO N₂L). Las diferencias significativas (*p*-valor < 0.05) se destacan con el símbolo “**”.

Analizando los 4 grupos de forma independiente (Tabla 15) se confirman los resultados observados en las tablas anteriores. Independientemente del medio de criopreservación no hay diferencias significativas entre aplicar el baño de nitrógeno o no. Por otro lado, se observa como con CryoSperm™ hay cierta tendencia a tener mayor cantidad de espermatozoides móviles y progresivos, y menor cantidad de inmóviles, que con SpermCryo™ All-round.

	CRYOSPERM (Origio)				SPERMCRYO (Cryos)				P
	NO N ₂ L		N ₂ L		NO N ₂ L		N ₂ L		
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/mL)	6.6 (11.5)	1.0	4.3 (8.7)	1.0	5.6 (12.3)	1.3	5.8 (10.4)	1.6	0.735
% MÓVILES	25.3 (15.8)	29.5	27.7 (15.0)	27.5	20.6 (12.2)	21.5	20.6 (14.6)	19.9	0.509
% PROGRESIVOS	15.4 (12.9)	14.4	17.3 (11.0)	18.9	10.1 (8.6)	8.8	10.8 (9.8)	9.9	0.337
% NO PROGRESIVOS	9.9 (5.2)	10.9	10.4 (6.1)	11.8	10.6 (5.9)	10.9	9.8 (5.9)	9.5	0.943
% INMÓVILES	74.7 (15.9)	70.5	72.3 (15.0)	72.5	79.4 (12.2)	78.5	79.5 (14.6)	80.1	0.509

Tabla 15. Diferencias en los resultados de los SCA's post-descongelación en función del crioprotector y de si las alícuotas se sometieron a un baño de nitrógeno líquido (N₂L) o no (NO N₂L). Las diferencias significativas (*p*-valor < 0.05) se destacan con el símbolo “**”.

Valorando los mismos parámetros que en la tabla anterior pero de manera independiente las muestras congeladas en rampa (Tabla 16) de las congeladas en perlas (Tabla 17), se observa para el caso de las congeladas en perlas la misma tendencia que en la tabla anterior (Tabla 15), en donde las muestras congeladas empleando CryoSperm™ muestran mejores resultados de motilidad post-descongelación. En cuanto a las de rampa no se puede concluir nada porque solo hemos procesado por esta técnica dos muestras, pero parece que se ven mejores resultados con SpermCryo™ All-Round.

	CRYOSPERM (Origio)				SPERMCRYO (Cryos)			
	NO N ₂ L		N ₂ L		NO N ₂ L		N ₂ L	
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/mL)	21.2 (14.7)	21.2	21.6 (10.8)	21.6	28.3 (20.3)	28.3	26.5 (11.8)	26.5
% MÓVILES	20.5 (8.1)	20.5	21.9 (6.2)	21.9	21.2 (6.9)	21.2	19.9 (0.3)	19.9
% PROGRESIVOS	10.9 (1.1)	11.0	13.1 (3.7)	13.1	11.1 (0.9)	11.1	10.2 (0.6)	10.2
% NO PROGRESIVOS	9.5 (7.0)	9.5	8.8 (2.5)	8.8	10.1 (6.0)	10.1	9.7 (0.9)	9.7

Tabla 16. Diferencias en los resultados de los SCA's post-descongelación de las muestras congeladas en rampa (N=2) en función del crioprotector y de si las alícuotas se sometieron a un baño de nitrógeno líquido (N₂L) o no (NO N₂L).

	CRYOSPERM (Origio)				SPERMCRYO (Cryos)				<i>P</i>
	NO N ₂ L		N ₂ L		NO N ₂ L		N ₂ L		
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/mL)	3.7 (9.1)	0.8	0.8 (0.3)	0.8	1.0 (0.5)	1.1	1.6 (1.6)	1.4	0.577
% MÓVILES	26.3 (17.1)	33.2	28.9 (16.2)	30.4	20.5 (13.3)	21.5	20.7 (16.2)	19.4	0.485
% PROGRESIVOS	16.3 (14.1)	18.7	18.1 (11.9)	20.7	9.9 (9.5)	7.6	10.9 (10.8)	6.8	0.406
% NO PROGRESIVOS	10.0 (5.3)	10.9	10.7 (6.6)	13.1	10.6 (6.2)	10.9	9.8 (6.5)	9.5	0.938

Tabla 17. Diferencias en los resultados de los SCA's post-descongelación de las muestras congeladas en perlas (N=10) en función del crioprotector y de si las alícuotas se sometieron a un baño de nitrógeno líquido (N₂L) o no (NO N₂L). Las diferencias significativas (*p*-valor < 0.05) se destacan con el símbolo “**”.

Por último hay que decir que se vieron espermatozoides móviles en todos los test post-descongelación.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Según los estudios epidemiológicos más amplios, la esterilidad afecta al 15% de la población en edad reproductiva de los países occidentales y experimenta una evolución creciente (SEF, 2012). La criopreservación de espermatozoides es un componente importante de la gestión de la fertilidad y gran parte de su aplicación exitosa parece afectar al resultado de las TRA (Di Santo *et al.*, 2011). Es por esto que optimizar las técnicas de criopreservación, y con ello obtener espermatozoides en número y con movilidad suficiente para poder ser utilizados en reproducción asistida, es de gran importancia.

Los resultados apoyan nuestra primera hipótesis, de que existe un efecto del transcurso del tiempo sobre la movilidad. Hubo cambios en los parámetros de movilidad entre el primer SCA realizado por el laboratorio general y el SCA de FIV realizado sobre 152 min después. Se observaron variaciones significativas en el porcentaje de espermatozoides móviles y no progresivos, que disminuyeron, y en el de inmóviles, que aumentaron; aunque la correlación entre el tiempo y las variaciones no fue significativa. Así, un estudio anterior (Chomsrimek *et al.*, 2008) vio que la motilidad del espermatozoide disminuye cuando el tiempo entre la eyaculación y el análisis aumenta, y que disminuyó de manera significativa a los 60 min después de la eyaculación, aproximadamente en un 20%. Dicha disminución de la motilidad debe ser debida al efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS), y secundariamente a un sobrecrecimiento bacteriano o al agotamiento de nutrientes por la actividad metabólica de los espermatozoides.

Al comparar los resultados del SCA de FIV con algunos de los criterios de la OMS lo lógico sería que las muestras no cumplieren dichos criterios, pues las muestras proceden de pacientes en estudio por PFP. Nuestros resultados muestran que un bajo porcentaje de muestras cumple el requisito de un porcentaje de espermatozoides móviles superior al 40%, lo que indica astenozoospermia. Además en muchas de ellas se observaban aglutinaciones de espermatozoides y un gran número de células redondas. Las anomalías en cuanto a movilidad pueden variar en cuanto a su gravedad, y frecuentemente se presentan asociadas con los otros dos parámetros fundamentales, cantidad o concentración de espermatozoides en el eyaculado y su morfología. El grado de las alteraciones se relaciona con la probabilidad de lograr una gestación espontánea, aunque no todas las alteraciones tienen el mismo significado pronóstico (SEF, 2012).

La criopreservación espermática es una técnica que ha permitido la conservación, durante un tiempo "indefinido", de células hasta el momento en que van a ser utilizadas en los procedimientos de reproducción asistida. A pesar de que este procedimiento amplió las alternativas de tratamiento de la infertilidad, aún hay una pérdida importante debida al daño celular que ocasiona la congelación

(Degl'Innocenti *et al.*, 2013). La recuperación de un número óptimo, de espermatozoides funcionalmente intactos de muestras descongeladas, siempre ha sido el objetivo principal de la criopreservación del semen (Bhavni Oberoi *et al.*, 2014). En este estudio, a pesar de los daños ocasionados por el paso del tiempo entre eyaculado y procesamiento y la congelación, hay que destacar que los test post-descongelación mostraron que había espermatozoides en número suficiente para realizar TRA; con los avances producidos en las técnicas de reproducción asistida, la presencia de un único espermatozoide en la muestra criopreservada es suficiente para realizar una ICSI.

A pesar de que los espermatozoides, en comparación con otros tipos celulares, parecen ser menos sensibles a la criopreservación esta puede conducir a cambios perjudiciales en la estructura y función de los espermatozoides (Di Santo *et al.*, 2011). La disminución de la motilidad de los espermatozoides se ha atribuido al daño en la membrana mitocondrial (un deterioro de la actividad mitocondrial puede explicar la reducción de la motilidad, pues el ATP generado por la fosforilación oxidativa en la membrana mitocondrial interna se transfiere a los microtúbulos, para llevar a cabo el movimiento). Aunque la motilidad no está directamente relacionada con la capacidad de fecundación, es uno de los factores más importantes que afectan a la calidad del espermatozoide (Di Santo *et al.*, 2011; Bhavni Oberoi *et al.*, 2014).

En cuanto a nuestra segunda hipótesis, de que se esperaba una mayor movilidad post-descongelación en las muestras en las que se empleó como medio de criopreservación CryoSperm™ los resultados muestran una tendencia a obtener mejores resultados con este que con SpermCryo™All-round, pero la diferencia no fue significativa. Un uso apropiado de los medios de criopreservación es uno de los factores de mayor impacto en la prevención de la fragmentación del ADN, mejorando así las tasas de supervivencia espermática (Di Santo *et al.*, 2011). Las diferencias encontradas pueden ser debidas a que SpermCryo™All-round es un medio más denso que en pequeños volúmenes (muestras destinadas a congelación en perlas) puede tener menor éxito de penetración en las células, mientras que los medios que se añaden en una proporción 1:1, siendo actualmente los más utilizados, como CryoSperm™, tienen más probabilidades de conseguir penetrar en una mayor cantidad de células y, por tanto mostrar unos mejores resultados de movilidad post-descongelación (Paras *et al.*, 2008; Oliva-Hernández & Marcos-González, 2010; Degl'Innocenti *et al.*, 2013). Aun así SpermCryo™All-round puede tener un mejor funcionamiento en muestras congeladas en rampa, donde se criopreserva una mayor cantidad de volumen y, proporcionalmente, se añade un mayor volumen de medio de criopreservación.

En contra de lo que preveíamos en nuestra tercera hipótesis de que existe una mayor movilidad post-descongelación en muestras sometidas a un baño de nitrógeno líquido previo a su almacenamiento en los tanques de nitrógeno líquido, que en aquellas en las que no se realiza dicho paso, nuestros resultados mostraron que no existían diferencias significativas para ninguno de los parámetros estudiados. Hoy en día sólo existe la tendencia a almacenar en nitrógeno líquido embriones vitrificados (Sansinena *et al.*, 2014) todos los otros tejidos o células normalmente se almacenan en fase gas debido al riesgo de contaminación cruzada durante el almacenamiento en fase líquida y a que no se han visto diferencias en viabilidad entre una forma de almacenamiento u otra (Lim *et al.*, 2010).

Por último hay que añadir que existe una gran variación entre individuos en la susceptibilidad de los espermatozoides a la criopreservación; como ya se comentó no hay parámetros espermáticos de análisis inicial que permitan una correlación positiva con la supervivencia espermática (a mayor cantidad de espermatozoides móviles por dosis no se obtienen mejores resultados tras la descongelación) (López *et al.*, 2012; Bhavni Oberoi *et al.*, 2014).

En conclusión, este trabajo refleja que los pacientes en estudio por PFP presentan, en algunos de los parámetros estudiados, valores por debajo de los recomendados por la OMS, lo que podría explicar los problemas de fertilidad que presentan; la importancia del tiempo en la disminución de la calidad espermática; pero sobretodo la necesidad de ajustar el protocolo de congelación a las características de la muestra para así mejorar los resultados post-descongelación. Aunque en el proceso de congelación-descongelación se vea disminuida la viabilidad de los espermatozoides, la criopreservación es una valiosa herramienta de ayuda clínica en la gestión de la infertilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Arakawa T, Carpenter JF, Kita YA & Crowe JH (1990). The basis for toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis. *Criobiology*; 27: 401-415.
- Arteaga Martínez SM & García Peláez MI (Eds) (2013). *Embriología humana y biología del desarrollo*. México DF: Panamericana.
- Asociación Española de Bancos de Tejidos (AEBT) (2008). *Estándares de la Asociación Española de Bancos de Tejidos*. 3ª Edición.
- Bhavni Oberoi SL, Sushil Kumar SVA & Pankaj Talwar C (2014). Study of human sperm motility post cryopreservation. *Medical Journal Armed Forces India*; 70: 349-353.
- Brassesco-Julio C, Lardizábal MN, Regincós-Lara M, Cairó-Doncos O, Prats-Ruiz L, Brassesco-Macazzaga M & Brassesco-Macazzaga A (2015). Nuevas demandas sociales en tratamientos de reproducción asistida. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*; 2 (1): 17-22.
- Callejo Olmos J, Cardesa Salzmann T, Domingo Domènech E, Gris Martínez JM, Manau Trullàs D, Marín Borràs S, Marina Rugero F, Márquez Vega C, Núñez Calonge R & Peón Muñoz S (2013). *Documento de Recomendaciones para la Preservación de la Fertilidad en Pacientes con Enfermedad de Hodgkin*. Barcelona: Editorial Glosa SL.
- Campos I, López D, Muñoz M, Ruzafa C, Miralles F & Magán R (2012). Congelación de semen. En Remohí J, Cobo A, Prados N, Romero JL & Pellicer A (Eds), *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Laboratorio de Reproducción Asistida* (pp. 288-291). 4ª Edición. Madrid: McGraw-Hill, Interamericana.
- Carlson BM (Ed) (2005). *Embriología humana y biología del desarrollo*. 3ª Edición. Madrid: Elsevier.
- Chomsrimek N, Choktanasiri W, Wongkularb A & O-Prasertsawat P (2008). Effect of time between ejaculation and analysis on sperm motility. *Thai Journal of Obstetrics and Gynaecology*; 16: 109-114.
- Cryos International (2014). *SpermCryo™All-round*. Consultada el 20 de Mayo de 2015, en: <https://dk.cryosinternational.com/for-clinics/products/spermcryo-all-round/>
- Degl'Innocenti S, Filimberti E, Magini A, Krausz C, Lombardi G, Grazia Fino M, Rastrelli G, Maggi M & Baldi E (2013). Semen cryopreservation for men banking for oligospermia, cancers, and other

- pathologies: prediction of post-thaw outcome using basal semen quality. *Fertility and Sterility*; 100 (6): 1555-1563.
- Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M & Borini A (2011). Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Advances in Urology*; 2012: 1-12.
- EFE (2014). *El 10% de los ciclos de reproducción asistida de Europa se realizan en España*. Consultada el 16 de Mayo de 2015, en <http://www.lne.es/vida-y-estilo/salud/2014/11/12/10-ciclos-reproduccion-asistida-europa/1670324.html>
- Gómez Ayala A-E (2011). Infertilidad femenina. Actualización. *Offarm*; 30 (5): 60-65.
- Hotaling JM, Lopushnyan NA, Davenport M, Christensen H, Pagel ER, Muller CH & Walsh TJ (2013). Raw and test-thaw semen parameters after cryopreservation among men with newly diagnosed cancer. *Fertility and Sterility*; 99 (2): 464-469.
- Jiménez MI, Serrano MG & Moreno JM (2011). Técnicas de criopreservación seminal. *Documentos de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular*; (3): 34-39.
- Lim JJ, Shin TE, Song S-H, Bak CW, Yoon TK & Lee DR (2010). Effect of liquid nitrogen vapor storage on the motility, viability, morphology, deoxyribonucleic acid integrity, and mitochondrial potential of frozen-thawed human spermatozoa. *Fertility and Sterility*; 94 (7): 2736-2741.
- López García MJ, Urbano Felices A & Cárdenas Povedano M (2012). *Manual de laboratorio para el análisis de semen*. OmniaScience (OmniaScience Publisher SL).
- Matorras Weinig R (Ed.) (2011). *Libro Blanco Sociosanitario. "La infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas"*. Madrid: Imago Concept & Image Development, S.L.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*; 247 (Cell Physiology 16): C125–C142.
- Núñez R (2015). *VI Simposio Internacional de Reproducción Asistida – Fundación Tambre*. Consultada el 16 de Mayo de 2015, en: <http://clinicatambre.com/vi-simposio-internacional-de-reproduccion-asistida-fundacion-tambre/>
- Oliva-Hernández J & Marcos-González M (2010). Efectos de la descongelación-lavado sobre la motilidad, vitalidad y morfología de espermatozoides de baja calidad. *Revista Internacional de Andrología*; 8 (1): 14-20.

- Origio (2010). *CryoSperm™*. Consultada el 20 de Mayo de 2015, en: http://www.origio.com/documents/5uwfvoq1tt9-PDS_CryoSperm_Oct2010_v2_web.pdf
- Paras L, Freisinger J, Esterbauer B, Schmeller N, Szlauer R & Jungwirth A (2008). Cryopreservation technique: Comparison of Test yolk buffer versus Spermcryo and vapour versus computerized freezing. *Andrologia*; 40: 18-22.
- Poirot C & Cherruau B (2005). Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*; 39 (2): 225-41.
- Sánchez I, Mar C, Castilla JA, Marcos M, Martín I, Galán A, Jiménez MI, Moreno JM, Serrano MG, García-Cobaleda I, Aulesa C, Lozano V, Sánchez C & de Montserrat J (2009). Técnicas para la preparación de semen en reproducción asistida. *Documentos de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular*; (3): 23-26.
- Sansinena M, Santos MV, Taminelli G & Zaritky N (2014). Implications of storage and handling conditions on glass transition and potential devitrification of oocytes and embryos. *Theriogenology*; 82 (3): 373-378.
- Sociedad Española de Fertilidad (SEF) (2012). *Saber Más Sobre Fertilidad y Reproducción Asistida*. Madrid: MSH impresores.
- Trottman M, Becker AJ, Stadler T, Straub J, Soljanik I, Schlenker B & Stief CG (2007). Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. *European Urology*; 52: 355-367.
- World Health Organization (WHO) (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5ª Edición.