

Evaluación de la motilidad espermática usando dos crioprotectores

Evaluation of sperm motility using two cryoprotectants

Sandra Abalde Graña¹, M^a Esther Rendal Vázquez¹, Mariana García García², M^a Jesús López Piñón², Marcos Carballal Rodríguez², Catarina Barbero Cancelo², Rosario Olvido Fernández Mallo¹, Inma Míguez Torre¹, Teresa Bermúdez González¹, Sonia Pértega Díaz³; Jacinto Sánchez Ibáñez¹

¹Unidad de Criobiología-Banco de Tejidos. CHUAC. A Coruña

²Unidad de Fecundación in vitro. CHUAC. A Coruña

³Unidad de Estadística. CHUAC. A Coruña

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, a tratamientos gonadotóxicos. La criopreservación seminal es la técnica que permite conservar y almacenar espermatozoides 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. 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.

Aceptado: 4/6/15

Correspondencia: Autor responsable:

Rendal Vázquez ME

Hospital Teresa Herrera

Unidad de Criobiología-Banco de Tejidos. CHUAC. A Coruña

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

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.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; 33; 15-26 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Palabras clave: *Infertilidad, Criopreservación, Semen, Sperm Class Analyzer (SCA)*

SUMMARY

Infertility is a problem that affects a lot of couples. One of its causes is a decreased semen quality due to, for example, gonadotoxic treatments. The cryopreservation of human semen is the technique that allows sperm preserving and storing without losing their fertilizing capacity; being a fundamental tool in assisted reproduction. The aim of this study was to optimize the cryopreservation technique. To this end, a study carried out on samples of patients under study by fertility problems, in which two cryoprotectant media (SpermCryo™ All-round and CryoSperm™) and the execution or non-execution of an immersion of the samples in liquid nitrogen (before storage) were compared; and the effect of the time between ejaculation and the processing on the quality of the sample. Variations were studied with an automatic analyzer by performing pre- and post-thaw sperm motility tests.

The results show no difference between the two cryoprotectants media, but seems to have a tendency to obtain better post-thaw mobility with either depending on sample characteristics. Moreover, the liquid nitrogen bath had no apparent effects on post-thaw results. However, we must highlight the importance of time in the processing of semen samples once liquefied, to avoid decreased sperm quality.

To improve post-thaw outcomes the key lies in the necessity to adjust the freezing protocol to the sample characteristics and a correct implementation of the protocol cryopreservation (selection and addition of cryoprotectant media...); favoring the management of infertility and the success of assisted reproduction techniques.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; 33; 15-26 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Key words: *Infertility, Cryopreservation, Frozen semen, Sperm Class Analyzer (SCA)*

INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un fenómeno que afecta aproximadamente al 15 % de las parejas que intentan concebir. En la actualidad las causas más comunes de infertilidad son la edad materna y el fallo en la función espermática; en casi la mitad de los casos de infertilidad masculina la causa radica en una hipofertilidad exclusiva o asociada a la femenina (1). De manera global, para el análisis de las muestras de semen se realiza un examen macroscópico, en el que se analizan parámetros como el volumen y la licuefacción, y un examen microscópico. Este último puede llevarse a cabo con un analizador automático, en el que se estudian características como la movilidad y la concentración (2-4).

La criopreservación seminal es la técnica que nos permite conservar espermatozoides a bajas temperaturas 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 (5-7).

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 Organización Mundial de la Salud (OMS); no hay parámetros espermáticos de análisis inicial que permitan una correlación positiva con la supervivencia espermática (4).

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 (4-5).

Para minimizar los efectos nocivos del enfriamiento 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. Las células poseen una velocidad de enfriamiento óptima donde los daños producidos son mínimos. 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) (5-6).

Los crioprotectores (CPA) presentes en los medios de congelación 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 (5-6).

Las muestras pueden sufrir alteraciones durante el periodo de almacenamiento, que se pueden traducir en una supervivencia nula después de la descongelación.

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 gli-

cerol (CPA penetrante) y rafinosa (CPA no penetrante, al igual que la glucosa) como crioprotectores (8-10).

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 (5).

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, se realizó este estudio con el objetivo de comprobar si existía un efecto del tiempo de espera para el procesado de la muestra sobre la movilidad de los espermatozoides; si existían 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); y por último, si existía 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 realizaba dicho paso.

MATERIAL Y MÉTODOS

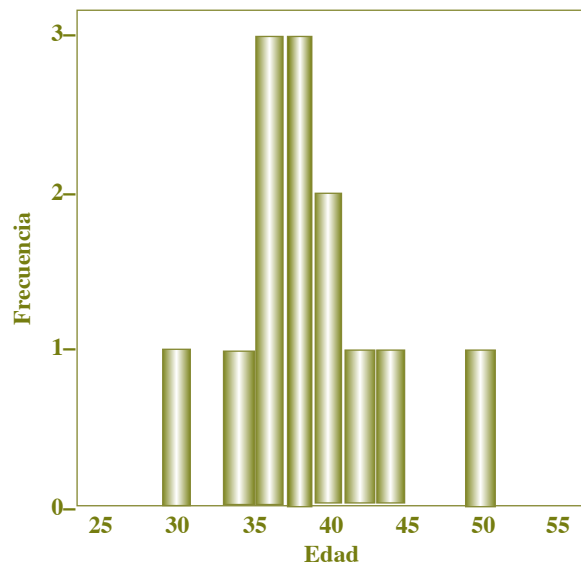
Se utilizaron un total de 13 muestras de semen de diferentes pacientes procedentes del laboratorio general del CHUAC. Dichos pacientes se encontraban en estudio por problemas de la fertilidad de la pareja (PFP), los cuales acudieron a la consulta del ginecólogo/urólogo debido a la incapacidad de concebir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

Dichas muestras fueron recogidas por el laboratorio general dentro del tiempo recomendado (inferior a 1 hora entre el eyaculado y la recepción de la muestra) y se sometieron a un análisis en el Sperm Class Analyzer®, 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, Este SCA se referenció como 1^{er} SCA.

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 1). 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.

FIGURA 1

Histograma de frecuencias de la edad de los pacientes.



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).

Se midió el volumen de la muestra, a continuación se colocó 0.2µL de semen en un portaobjetos (Leja®) y se valoró en el microscopio 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.

Capacitación mediante gradientes

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

Adición del medio de criopreservación

Se dividió el volumen final de la muestra de semen o de la suspensión de espermatozoides en dos tubos. En uno de ellos se añadió el medio de criopreservación SpermCryo™ All-round, en una proporción 1:3, y en el otro CryoSperm™, en una proporción 1:1. Transcurridos 30 minutos se procedió a la congelación mediante una de las dos técnicas mencionadas (en rampa o en perlas).

Congelación en rampa

Se distribuyó el semen diluido con el crioprotector en criotubos (Thermo Fisher Scientific Inc.), con un volumen de 0.8 mL en cada uno de ellos y se procedió a la congelación de forma programada utilizando un congelador biológico (CM 2000). El programa de congelación se muestra en la Tabla 1. Al finalizar este proceso los criotubos fueron almacenados en tanques de nitrógeno, en la fase gas del nitrógeno líquido.

Congelación en perlas

Se realizaron perlas de 50 ó 100 µl de la suspensión de espermatozoides diluida con el medio crioprotector. Para ello, con la ayuda de una pipeta, se dejó caer una gota de la suspensión sobre un pequeño pocillo realizado sobre nieve car-

TABLA 1

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

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

bónica. Después de unos minutos se colocaron entre 2 y 4 perlas por criotubo (previamente enfriado en la nieve carbónica) para su posterior almacenamiento.

Almacenamiento

Una parte de los criotubos (la mitad correspondiente a cada crioprotector) se sometió a un baño de nitrógeno líquido, a continuación se almacenaron en tanque de nitrógeno líquido, en fase gas y a una temperatura de unos -150°C durante al menos 1 semana.

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 transfirió a un tubo de ensayo y se dejó descongelar a temperatura ambiente durante 10 minutos; pasado este tiempo se añadió 1 ml de medio G-IVF™ PLUS gota a gota y se centrifugó durante 5 min a 1100 rpm; se retiró el sobrenadante y se añadió un volumen de Sequential Fert™ igual al volumen de la muestra congelada en el criotubo. Se dejó reposar un par de minutos y se realizó la valoración mediante un análisis en el SCA®.

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 (1er 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 $p\text{-valor} < 0.05$. Los datos fueron analizados con el programa estadístico IBM SPSS Statistic 19.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EEUU).

RESULTADOS

La edad de los pacientes osciló entre los 30 y los 49 años, con una media de $38,15 \pm 4,77$ años y una mediana de 37 años (Figura 1).

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 2).

Los resultados del análisis de los datos del 1er SCA realizado por el laboratorio general (dentro del tiempo recomendado por la OMS) mostraron 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 iban desde los 0,5 hasta los 94 millones/mL. En cuanto a la concentración de espermatozoides en el total de la muestra los valores oscilaban 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 oscilaba 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, superaban 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) oscilaba 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 3).

TABLA 2

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 1er SCA y recepción de la muestra y 1er SCA.				
	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 1er SCA	39,3 (17,9)	40,5	15,0	65,0
TIEMPO (min) DESDE LA RECEPCIÓN HASTA EL 1er SCA	10,6 (1,9)	10,0	10,0	17,0

TABLA 3

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.				
	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

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 4).

En la Tabla 5 se mostraron 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.

Comparando algunos de los valores del SCA de FIV con los criterios de la OMS (Tabla 6) se observó que el requisito que no cumplían la mayoría de las muestras era 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.

TABLA 4

Media y desviación típica (DT), mediana, mínimo y máximo del tiempo transcurrido entre la recepción de la muestra o el 1er SCA y el SCA de FIV.				
	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 1er 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 de los resultados de los parámetros medidos en los SCA's realizados en el laboratorio de FIV.				
	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		
Comparación con los criterios de la OMS. %: porcentaje equivalente de muestras que superan el valor límite de referencia.		
		%
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES(millones/mL) > 14,9		76,9
% MÓVILES > 40		30,8
% PROGRESIVOS > 31,9		53,8

Se descartaron diferencias significativas en la concentración de espermatozoides entre el SCA del laboratorio general y el SCA de FIV (Tabla 7).

Se observaron cambios significativos en el porcentaje de espermatozoides móviles, no progresivos e inmóviles, pero no se observaron cambios significativos en el porcentaje de espermatozoides progresivos, aunque era inferior en el SCA de

FIV (Tabla 8). Era un 27 % inferior la cantidad de espermatozoides móviles en el SCA de FIV con respecto al SCA inicial, los cuales se acumulaban en los no progresivos, y los no progresivos en los inmóviles, es por esto que el porcentaje de espermatozoides inmóviles aumentó en cerca de un 20 %.

A mayor tiempo transcurrido entre el SCA inicial, del laboratorio general, y el SCA de FIV se observaron 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 era significativa (Tabla 9).

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 10) se observó que las muestras que fueron procesadas por perlas eran peores, como cabía esperar; la

TABLA 7							
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 “***”.							
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 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 “***”.							
	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					
Asociación entre el tiempo transcurrido desde el SCA del laboratorio general (1er 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 “***”.					
		% MÓVILES	% PROGRESIVOS	% NO PROGRESIVOS	% INMÓVILES
TIEMPO (min) DESDE EL 1er SCA	Rho(p)	0,238	-0,154	0,539	0,354
AL SCA DE FIV	P	0,456	0,632	0,070	0,259

TABLA 10

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).

	RAMPA (N=2)		PERLAS (N=11)	
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES (millones/mL)	88,5 (14,8)	88,5	30,3 (24,6)	24,1
% 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

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 diferían tanto en cuanto al porcentaje de espermatozoides no progresivos, pero sí lo hacían 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.

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 11). 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.

El uso de un medio crioprotector u otro no mostró diferen-

cias significativas en los resultados de movilidad post-descongelación (Tabla 12). 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™.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la aplicación de un baño de nitrógeno o no a los criotubos antes de su almacenamiento (Tabla 13).

Analizando los 4 grupos de forma independiente (Tabla 14) se confirmaron los resultados observados en las tablas anteriores. Independientemente del medio de criopreservación no había diferencias significativas entre aplicar el baño de nitrógeno o no. Por otro lado, se observó como con CryoSperm™ había cierta tendencia a tener mayor cantidad de espermatozoides móviles y progresivos, y menor cantidad de inmóviles, que con SpermCryo™ All-round.

Valorando los mismos parámetros que en la tabla anterior pero de manera independiente las muestras congeladas en rampa (Tabla 15) de las congeladas en perlas (Tabla 16), se observó para el caso de las congeladas en perlas la misma

TABLA 11

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 “”.**

	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 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 “***”.					
	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 de si las alícuotas se sometieron a un baño de nitrógeno líquido (N ₂ L) o no (NO N ₂ L). Las diferencias significativas (p-valor < 0,05) se destacan con el símbolo “***”.					
	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 del crioprotector y de si las alícuotas se sometieron a un baño de nitrógeno líquido (N ₂ L) o no (NO N ₂ L). Las diferencias significativas (p-valor < 0.05) se destacan con el símbolo “***”.									
	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

tendencia que en la tabla anterior (Tabla 14), en donde las muestras congeladas empleando CryoSperm™ mostraron mejores resultados de motilidad post-descongelación. En cuanto a las de rampa no se pudo concluir nada porque solo se procesaron por esta técnica dos muestras, pero parecía que se venían mejores resultados con SpermCryo™ All-Round.

En todos los test post-descongelación se vieron espermatozoides móviles.

DISCUSIÓN

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 cre-

ciente (11). 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 (7). 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.

Nuestros resultados muestran 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

TABLA 15

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)			
	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 ESPERMATOZOIDEOS (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 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 “”.**

	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 ESPERMATOZOIDEOS (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

fue significativa. Así, un estudio anterior (12) 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 cumplieran dichos criterios, pues las muestras proceden de pacientes en estudio por PFP. Nuestros resultados mostraron que un bajo porcentaje de muestras cumplía el requisito de un porcentaje de espermatozoides móviles superior al 40 %, lo que indicaba 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 (11).

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 (13). La recuperación de un número óptimo, de espermatozoides funcionalmente intactos de muestras descongeladas, siempre ha sido el objetivo principal de la criopreservación del semen (14). 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 (inyección intracitoplasmática de espermatozoides).

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 (7). 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 (7, 14).

Nuestro estudio mostró una tendencia a obtener mejores resultados y una mayor movilidad post-descongelación en las muestras con medio de criopreservación CryoSperm™ 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 (7). 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 (8,13,15). 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 nuestro estudio se observó que no existían diferencias significativas para ninguno de los parámetros estudiados entre las muestras sometidas a un baño de nitrógeno líquido previo a su almacenamiento en los tanques de nitrógeno líquido comparado con aquellas en las que no se realiza dicho paso. Hoy en día sólo existe la tendencia a almacenar en nitrógeno líquido embriones vitrificados (16) 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 (17).

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) (4,14).

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.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Laboratorio de área por la cesión de las muestras de semen para el estudio y al personal de la Unidad de Fecundación in vitro del Hospital Modelo por la cesión del medio crioprotector.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Matorras-Weinig R (Ed.)**. Libro Blanco Sociosanitario. "La infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas". Madrid: Imago Concept & Image Development, S.L. 2011.
2. **Poirot C, Cherruau B**. Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 2005, 39(2):225-241.
3. **World Health Organization (WHO)**. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5ª Edición. 2010.
4. **López-García MJ, Urbano-Felices A, Cárdenas-Povedano M**. Manual de laboratorio para el análisis de semen. OmniaScience (OmniaScience Publisher SL). 2012.
5. **Jiménez MI, Serrano MG, Moreno JM**. Técnicas de criopreservación seminal. Documentos de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular 2011, (3):34-39.
6. **Campos I, López D, Muñoz M, Ruzafa C, Miralles F, Magán R**. Congelación de semen. En: Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Laboratorio de Reproducción Asistida. 4ª Edición. Editado por: Remohí J, Cobo A, Prados N, Romero JL & Pellicer A. Madrid: McGraw-Hill, Interamericana; 2012: 288-291.
7. **Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A**. Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. Advances in Urology 2012, 2012:1-12.
8. **Paras L, Freisinger J, Esterbauer B, Schmeller N, Szlauer R, Jungwirth A**. Cryopreservation technique: Comparison of Test yolk buffer versus Spermcryo and vapour versus computerized freezing. Andrologia 2008, 40:18-22.
9. **CryoSperm™**. 20 de Mayo de 2015. En. Online: Origio; 2010.
10. **SpermCryo™ All-round**. 20 de Mayo de 2015. En. Online: Cryos International; 2014.
11. **Sociedad Española de Fertilidad (SEF)**. Saber Más Sobre Fertilidad y Reproducción Asistida. Madrid: MSH impresores. 2012.
12. **Chomsimek N, Choktanasiri W, Wongkularb A, O-Prasertsawat**. Effect of time between ejaculation and analysis on sperm motility. Thai Journal of Obstetrics and Gynaecology 2008, 16: 109-114.
13. **Deg'I Innocenti S, Filimberti E, Magini A, Krausz C, Lombardi G, Grazia Fino M, Rastrelli G, Maggi M, Baldi E**. Semen cryopreservation for men banking for oligospermia, cancers, and other pathologies: prediction of post-thaw outcome using basal semen quality. Fertility and Sterility 2013; 100 (6): 1555-1563.
14. **Bhavni Oberoi SL, Sushil Kumar SVA, Pankaj Talwar C**. Study of human sperm motility post cryopreservation. Medical Journal Armed Forces India 2014, 70:349-353.
15. **Oliva-Hernández J, Marcos-González M**. Efectos de la descongelación-lavado sobre la motilidad, vitalidad y morfología de espermatozoides de baja calidad. Revista Internacional de Andrología 2010, 8 (1): 14-20.
16. **Sansinena M, Santos MV, Taminelli G, Zaritky N**. Implications of storage and handling conditions on glass transition and potential devitrification of oocytes and embryos. Theriogenology 2014, 82(3):373-378.
17. **Lim JJ, Shin TE, Song S-H, Bak CW, Yoon TK, Lee DR**. 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 2010, 94(7):2736-2741.