



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Universitat Politècnica de València
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del medio Rural
(ETSIAMN)

Trabajo final de Grado en Biotecnología

Ensayo de supervivencia espermática como método
para evaluar la toxicidad de los crioprotectores usados
en los programas de criopreservación espermática en
Reproducción Asistida:
Diseño de dos índices de toxicidad basados en
parámetros cinéticos del espermatozoide

LaFe
Hospital Universitari i Politècnic

Curso académico 2017-2018
Valencia, junio 2018
Autora: Sara Gómez Lázaro

Tutora: María Inmaculada Molina Botella
Co-tutor externo: Pedro Fernández Colom



Licencia Creative Commons

TÍTULO Y PALABRAS CLAVE

Ensayo de supervivencia espermática como método para evaluar la toxicidad de los crioprotectores usados en los programas de criopreservación espermática en Reproducción Asistida: Diseño de dos índices de toxicidad basados en parámetros cinéticos del espermatozoide humano.

Palabras clave (español): Criopreservación, Vitalidad, Motilidad, Espermatozoides, Crioprotector, Hos-test, Eosina, TYB, SCB.

RESUMEN

El proceso de congelación de espermatozoides tiene un gran impacto sobre la calidad de la muestra, destacando fundamentalmente daños mecánicos y osmóticos que van a llevar a un descenso de la viabilidad espermática. La vitalidad espermática se refleja en la proporción de espermatozoides que están vivos, atendiendo a su capacidad osmorreguladora o de exclusión de colorantes. Asimismo, a pesar de que hay diferentes estudios centrados en determinar el protocolo de congelación/descongelación óptimo, son muy pocos los esfuerzos que se han dedicado a realizar estudios independientes de toxicidad espermática para elegir el crioprotector que minimice los efectos citotóxicos que tienen estos agentes sobre el espermatozoide.

En este trabajo se realizaron dos experimentos sucesivos. En primer lugar se analizó la posible correlación de dos ensayos de viabilidad distintos (test de la eosina y HOS-test) con la motilidad de las muestras, considerando que aquellos espermatozoides viables serán los que presenten algún tipo de motilidad, con el fin de obtener una nueva variable más objetiva que permita estimar de forma fiable los resultados obtenidos en términos de viabilidad espermática.

Los resultados mostraron que la motilidad total (MT) era el tipo de motilidad que mejor se correlacionaba con los resultados del HOS-test ($R^2=97.10$, $CMR=1,36 \cdot 10^{-5}$), mientras que los resultados obtenidos mediante el test de la eosina no presentan correlación alguna con ningún tipo de motilidad. De acuerdo con los resultados obtenidos, la MT fue la variable de elección que se

empleó en la segunda parte del estudio puesto que es una medida más objetiva, sencilla y rápida.

Por tanto, la MT aportará mayor solidez al estudio de la evaluación de toxicidad de los distintos crioprotectores que los test de vitalidad clásicos.

A continuación, se evaluó la toxicidad, en base a la MT, de dos crioprotectores distintos, uno a base de yema de huevo (TYB) y otro sin excipientes de origen animal (SCB), a distintas concentraciones con el fin de optimizar los protocolos de congelación de espermatozoides humanos en las unidades de reproducción humana asistida. Los ensayos de supervivencia espermática hasta las 24 horas revelaron que a tiempos cortos de incubación no se observaron diferencias significativas entre la pérdida de MT entre las muestras control y las muestras incubadas con los distintos crioprotectores ($p\text{-val}= 0,2621$). Sin embargo, a partir de la primera hora, las muestras incubadas con el crioprotector SCB mostraron una mayor pérdida de MT ($p\text{-val}=0,013$). Tras dos horas de incubación, se observó un cambio de tendencia, ya que las muestras incubadas con SCB parecían preservar mejor la MT, mientras que se evidenció una mayor caída de MT en las muestras control y las incubadas con TYB ($p\text{-val}=0,0247$). Por tanto se recomienda que entre la adición del crioprotector y el inicio de la congelación no transcurra más de una hora, ya que a tiempos cortos no se observan diferencias entre el medio control y los medios crioprotectores, en términos de MT.

TITLE AND KEY WORDS

Sperm survival test as a method to evaluate the toxicity of cryoprotectants used in sperm cryopreservation programs in Assisted Reproduction: Design of two toxicity indexes based on kinetic parameters of human sperm.

Key words: Criopreservation, Vitality, Motility, Sperm, Crioprotector, Hos-test, Eosin, TYB, SCB.

ABSTRACT

The process of sperm freezing has a great impact among the quality of the sample, promoting mainly mechanical and osmotic damage that can lead to a decrease on the sperm vitality of the sample. The sperm vitality is reflected in the proportion of sperm that are alive, according to their osmoregulatory capacity or their ability of exclude dyes from its membrane.

Although there are different studies focused on determining the optimal freezing / thawing protocol, very few efforts have been devoted to perform independent studies of sperm toxicity in order to choose the cryoprotectant that minimizes the most the cytotoxic effects that these agents have on the spermatozoa.

In this work, two successive experiments were carried out. In the first place, the possible correlation of two different viability tests (eosin test and HOS-test) with the motility of the samples was analyzed, considering that the viable sperm will be those that present some type of motility. This analysis was developed in order to obtain a new more objective variable that allows to reliably estimate the results obtained in terms of sperm viability.

The results showed that the total motility (TM) was the type of motility that best correlated with the results of the HOS-test ($R^2 = 97.10$, $RMS = 1.36 \cdot 10^{-5}$), while the results obtained by the eosin test presented no correlation with any type of motility. According to the results obtained, the TM was the chosen variable that would be used in the second part of the study since it is a more objective, simple and quicker. Therefore, the robustness of the study of the toxicity of

different cryoprotectants is increased by using a toxicity index based on sperm total motility rather than by the use of classical viability tests. Then, the toxicity of two different cryoprotectants, one based on egg yolk (TYB) and another without animal extents (SCB), was studied by using the TM. Different concentrations were analysed in order to optimize the protocols of human sperm freezing in Assisted Reproduction.

Sperm survival tests up to 24 hours revealed that at short incubation times there were no significant differences between the decrease in TM showed in the control samples and the ones that were incubated with the different cryoprotectants ($p\text{-val} = 0.2621$). However, from the first hour, the samples incubated with the cryoprotectant SCB showed a greater loss of TM ($p\text{-val} = 0.013$). After two hours of incubation, a change in trend was observed, since the samples incubated with SCB seemed to have a better preservation of the TM, while a greater TM decrease was observed in the control samples and those incubated with TYB ($p\text{-val} = 0, 0247$).

Therefore, it will be recommended that the time between the addition of the cryoprotectant and the onset of freezing process will not be longer than one hour, since at short times no differences are observed between the control medium and the cryoprotective means, in terms of sperm motility.

Resumen de datos referentes al presente trabajo

TÍTULO Y PARAULES CLAU

Assaig de supervivència espermàtica com a mètode per a evaluar la toxicitat dels crioprotectors emprats en els programes de criopreservació espermàtica en Reproducció Assistida: Diseny de dos índexs de toxicitat basats en paràmetres cinètics de l'espermatzoide humana.

Paraules clau (Valencià): Criopreservació, Vitalitat, Motilitat, Esperma, Crioprotector, Hos-test, Eosina, TYB.

DATOS DEL TFG

AUTORA:	Sara Gómez Lázaro	DNI:	44889155D
TUTORA:	María Inmaculada Molina Botella	FECHA Y LUGAR	Valencia, junio de 2018
TUTOR EXTERNO:	Pedro Fernández Colom	TITULACIÓN:	Grado en Biotecnología

LUGAR DE REALIZACIÓN DEL TRABAJO:	Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia) Unidad de Reproducción Asistida (FIV)
TIPO DE LICENCIA DE ACCESO Y DIFUSIÓN	Licencia Creative Commons CC BY-NC-SA 4.0

Agradecimientos

En primer lugar, gracias al personal de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, en especial a Sagrario por su paciencia infinita y su colaboración en este trabajo.

En segundo lugar, mil gracias a '*la jefa*' Andrea Palomar por su apoyo; no tengo ni la más mínima duda de que sin tu ayuda este trabajo no habría sido posible.

Por último mi más sincero agradecimiento a Inmaculada Molina, por aceptarme en su '*equipo*' y hacerme sentir parte de él en todo momento. Gracias por tu cercanía, confianza y profesionalidad; la ciencia necesita más personas tan comprometidas como tú.

Espero poder seguir aprendiendo a vuestro lado muchos años más.

*A mis abuelos y a mis padres, por su tesón y
cariño; y, en especial, en memoria de mi abuelo Ángel,
por enseñarme que nunca debemos olvidar
quiénes somos ni de dónde venimos.*

Índices

ÍNDICE

de contenidos

1. Introducción	1
1.1 Infertilidad y Técnicas de Reproducción Asistida.....	1
1.2 Criopreservación.....	2
1.3 Agentes crioprotectores	4
1.4 Parámetros espermáticos	5
1.4.1 Motilidad espermática	5
1.4.2 Concentración espermática	7
1.4.3 Morfología	7
1.4.4 Viabilidad espermática	7
2. Justificación y objetivos	10
3. Materiales y métodos	11
3.1 Obtención de muestras.....	11
3.2 Ensayo de obtención del modelo viabilidad-motilidad	11
3.2.1 Capacitación espermática.....	11
3.2.2 Evaluación de la motilidad automática progresiva y total (CASA).....	12
3.2.3 Evaluación de la vitalidad espermática mediante el HOS-test.....	13
3.2.4 Evaluación de la vitalidad espermática mediante el test de la Eosina.....	14
3.3 Ensayo de toxicidad	15
3.4 Análisis estadísticos.....	17
3.5 Diseño experimental y variables estudiadas	18
4. Resultados y discusión	19
4.1 <u>Experimento I</u> : Relación entre el parámetro de la motilidad espermática junto con la viabilidad, analizada mediante el Hos-test y el test de la eosina	19
4.2 <u>Experimento II</u> : Evaluación de la toxicidad generada por distintos crioprotectores.....	23
5. Conclusiones	31
6. Bibliografía	32

ÍNDICE de tablas

Tabla 1: Valores de infertilidad masculina representativos de cada continente empleando estimaciones poblacionales mundiales. (Agarwal <i>et al.</i> , 2015).....	1
Tabla 2: Valores de referencia en el diagnóstico espermático propuestos por la OMS en distintos períodos. (Sikka y Hellstrom, 2016).....	9
Tabla 3: Valores medios de motilidad progresiva, motilidad total y HOS en la serie de muestras	20
Tabla 4: Diferentes ecuaciones para predecir el resultado del HOS a partir de la motilidad total y progresiva.....	20
Tabla 5: Diferentes ecuaciones para predecir el resultado del test de la eosina a partir de la motilidad total y progresiva.....	21
Tabla 6: valores medios de MT (%) y sus desviaciones estándares (SD) obtenidos para cada CP a cada tiempo estudiado.....	23
Tabla 7: resultados del test ANOVA procedente de los datos de las muestras incubadas un período de 10 minutos. Se muestran las medias de las motilidades totales (MT) de cada muestra junto con sus desviaciones estándares (SD).....	24
Tabla 8: resultados del test ANOVA procedente de los datos de las muestras incubadas un período de 1 hora. Se muestran las medias de las motilidades totales (MT) de cada muestra junto con sus desviaciones estándares (SD).....	25
Tabla 9: resultados del test ANOVA procedente de los datos de las muestras incubadas un período de 2 horas. Se muestran las medias de las motilidades totales (MT) de cada muestra junto con sus desviaciones estándares (SD).....	25
Tabla 10: resultados del test ANOVA procedente de los datos de las muestras incubadas un período de 24 horas. Se muestran las medias de las motilidades totales (MT) de cada muestra junto con sus desviaciones estándares (SD).....	27

ÍNDICE de figuras

Figura 1: Incremento de los nacimientos de niños concebidos mediante Técnicas de Reproducción Asistida a lo largo del tiempo. La línea roja representa la media anual que contempla datos de todos los países registrados; en las columnas, los valores máximos representados en azul y los valores mínimos representados en verde que se registraron cada año en dichos países. (Ferraretti <i>et al.</i> , 2017).....	2
Figura 2: Esquema del procedimiento general empleado en la criopreservación espermática (OVODONANTE, 2016).....	2
Figura 3: Representación de los tipos de motilidad espermática visualizados empleando una cámara Mackler (OVODONANTE, 2017a).....	5
Figura 4: Tipos de motilidad espermática existentes (OVODONANTE, 2017b).....	5
Figura 5: Representación de los cambios morfológicos del espermatozoide humano sujeto a estrés hipo-osmótico (OVODONANTE, 2017c).....	8
Figura 6: Procedimiento seguido en el protocolo de capacitación por Swim Up.....	11
Figura 7: Dispositivos empleados para el estudio de motilidad y concentración (Spermtrack, microscopio de contraste de fases, cámara, ordenador y software de análisis).....	12
Figura 8: (A) 100 ul de la solución hiposmótica se transfieren a un vial eppendorf. (B) Mezcla de 10 ul de muestra con los 100 ul de la solución hiposmótica. (C) Incubación a 37°C y 5% CO ₂ . (D) Cargar 10 ul de la mezcla en un portaobjetos y cubrir con cubreobjetos. Observar la muestra al microscopio a 200 o 400 aumentos.....	13
Figura 9: Diferentes patrones de hinchazón de la cola debido a la presencia de los espermatozoides en una solución hiposmótica. A, B y C. Distintos espermatozoides con el mismo patrón de cola enrollada (espermatozoides vivos). D. Espermatozoide que no presenta enrollamiento, espermatozoide muerto (señalado con la flecha) y 3 espermatozoides con diferentes patrones de enrollamiento de cola.....	14
Figura 10: Extensión de muestra sometida a la solución de eosina. Se observan espermatozoides teñidos y refringentes. (Melliso E., 2010).....	14
Figura 11: Esquema de los pasos llevados a cabo en el ensayo de toxicidad.....	16
Figura 12: : Reactivos empleados en el ensayo de toxicidad: (A) Test Yolk Buffer (TYB) (IRVINE SCIENTIFIC); (B) Criopreservation Buffer (SCB), (COOK MEDICAL).....	16
Figura 13: Vista a 40X de resultados del HOS-test de una muestra capacitada (A) y de una muestra en fresco (B).....	19

ÍNDICE de figuras

Figura 14: Vista a 40X de resultados del test de la eosina de una muestra en fresco.....	19
Figura 15: (A) datos de MT (%) en comparativa a la viabilidad estudiada mediante el HOS-test (%). Se observa la misma tendencia y por tanto, correlación. (B) datos de MT (%) en comparativa a la viabilidad estudiada mediante el test de la eosina (%). Se observa una tendencia totalmente dispar entre ambos parámetros y por tanto se confirma la imposibilidad de correlacionar ambas medidas.....	22
Figura 16: Imágenes procedentes de dos alícuotas de la misma muestra, donde se puede apreciar en las figuras A y B el resultado obtenido tras la incubación durante 1h (A) y 2h (B) en TYB (A) y SFB (B), respectivamente.....	26
Figura 17: Comparativa entre las distintas alícuotas de una misma muestra sometida a 24h de incubación con los distintos CP testados, donde: (A) Control-IVF, (B) TYB 1:1, (C) TYB 1:2, (D) SCB 1:1, (E) SCB 1:2	28
Figura 18: Descenso de la MT (%) en las muestras sometidas a incubación en el tiempo (10 minutos y 24h) con distintos CP (IVF, TYB 1:1, TYB 1:2, SCB 1:1, SCB 1:2).....	29

ÍNDICE

de abreviaturas

ANOVA (ANAlisys Of VAriance)
BSA: Suero de Albúmina Bovina
BSP: Bull Seminal Plasma Proteins
CASA: Computer-Assited Semen Analyzer
CMR: Cuadrado Medio Residual
CP: Crioprotector
DMSO: Dimetil-sulfóxido
EIM: European IVF-Monitoring
EOS: % de espermatozoides viables de acuerdo al test de eosina
ESHRE: Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología
EVI: Índice de vitalidad del test de la eosina
FIV: Fecundación In Vitro
FIV-ICSI: Fecundación In Vitro con Inyección Intracitoplasmática
HOS-test: Hipoosmotic Swelling-test
HSA: Seroalbúmina humana
HVI: Índice de Vitalidad del HOS-test
ICSI: Inyección Intracitoplasmática
ISAS: Integrated Semen Analysis System
LDL: Low Density Lipoproteins
MNP: Motilidad No Progresiva
MP: Motilidad Progresiva
MT: Motilidad Total
OMS: Organización Mundial de la Salud
p-val: p-valor
RTE: Recuento Total de Espermatozoides
RTEM: Recuento Total de Espermatozoides Móviles
SCP: Sidney Crioprotectant
SD: Desviación Típica
SFB: Suero Fetal Bovino
TF: Tasa de Fecundación
TG: Tasa de Gestación
TI: Tasa de Implantación
TMI: Índice de Toxicidad en base a la Motilidad Total

ÍNDICE de abreviaturas

to: tiempo inicial

TRA: Técnicas de Reproducción Asistida

tx: tiempo a determinar, x.

TYB: Test Yolk Buffer

v/2v: volumen a doble volumen

v/v: volumen a volumen

ZP: Zona Pelúcida

Unidades empleadas:

°C: grados centígrados

g: fuerza centrífuga relativa

μl: microlitros

mm : milímetros

ml: mililitros

μm s⁻¹: micrometros/segundos

Introducción

1. Introducción

1.1 Infertilidad y Técnicas de Reproducción Asistida

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infertilidad como “una enfermedad del sistema reproductivo determinada por la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección” (Zegers-Hochschild *et al.*, 2010), reconociéndola como un problema de salud pública en todo el mundo.

Así pues, pese a que social y culturalmente se destaca el hecho de tener descendencia como deseo de muchas parejas, no todas lo conseguirán de manera espontánea. Requiriendo, por tanto, asistencia médica para resolver sus problemas de fertilidad y destacando que, pese al crecimiento del campo de la medicina reproductiva, aquellas personas que pertenezcan a entornos subdesarrollados o con limitación de recursos posiblemente no llegarán a tener sus necesidades cubiertas. (Boivin *et al.*, 2007; OMS 2018)

De acuerdo con un estudio demográfico realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), sobre la base de la población mundial, alrededor de 40 millones de parejas se veían afectadas por este problema en la década de los 90, aumentando a 48.5 millones en 2010 (Mascarenhas *et al.*, 2012). Asimismo, de acuerdo con los estudios de Sharlip *et al.*, (2002) se estima que alrededor del 15% de parejas tienen problemas de infertilidad, de los cuales el porcentaje atribuible al factor masculino oscila entre el 20-70% de los casos. En este sentido el factor masculino es responsable del 40% de éstos problemas de infertilidad, siendo un 20% atribuible a factores mixtos y esterilidad idiopática. Esto se traduce en que la proporción de hombres infértiles varía de 2,5% a 12%, mostrando diferencias según la región de la que se extraen los datos, de acuerdo con la Tabla 1 (Agarwal *et al.*, 2015).

Tabla 1: Valores de infertilidad masculina representativos de cada continente empleando estimaciones poblacionales mundiales. (Agarwal *et al.*, 2015).

	Total population of Region	Male population of Region	Total Male reproductive population (15-60y)	Male Infertility, %	Infertile Men
North America	347,388,982	171,213,918 (49.2%)	116,254,250 ^a	9.4% [4]	10,927,899
Latin America/Caribbean	582,418	287,634 (49.3%)	361,099	Unknown	Unable to Calculate
Sub-Saharan Africa	850,000	420,000 (49.4%)	218,348	2.5%-4.8%	5,459-10,481
Eastern Europe/Central Asia	399,110	190,718 (47.8%)	259,421	8-12% [14]	20,754-31,130
Europe	734,228,972	353,542,772 (48.1%)	248,187,025 ^a	7.5% [11]	18,614,027
Asia/Pacific	3,653,257	1,875,094 (51.3%)	1,199,437	Unknown	Unable to Calculate
Oceania	35,162,670	17,699,546 (50.3%)	11,752,499 ^a	9% [10]	1,057,725

Del mismo modo, según datos publicados por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) (Ferraretti *et al.*, 2017) en Europa ha aumentado el número de ciclos de FIV-ICSI (Fecundación In Vitro, Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides) empleados en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) de 203.225 en 1997 a 609.973 en 2011, cuando se llevaron a cabo más de 600.000 ciclos y nacieron más de 130.000 niños gracias a estas técnicas. Se ha observado que durante los 15 primeros años de actividad del EIM (European IVF- Monitoring) 6 millones de ciclos fueron reportados, dando lugar al nacimiento de más de 1 millón de niños (Ferraretti *et al.*, 2017), tal y como se refleja en la Figura 1. Posteriormente se realizaron 640.144 y 686.271 ciclos, en 2012 y 2013 respectivamente, observándose un incremento de +7.2% (Calhaz-Jorge *et al.*, 2017).

Asimismo, el aumento de la infertilidad masculina se ve incrementado por otros aspectos como el retraso de la paternidad, y por tanto, edad avanzada de los progenitores, así como otros factores ambientales. Según los estudios de Thonneau *et al.* (1991) los factores masculinos están involucrados,

combinados o por sí solos, en aproximadamente la mitad de las causas de la infertilidad. El estrés diario, ingesta de fármacos o condicionantes genéticos afectan al espectro de fertilidad masculina, caracterizado por una reducción de la calidad del espermatozoides y su capacidad fecundante (tanto en las TRA como en los casos de relaciones sexuales desprotegidas). Además, los datos epidemiológicos sugieren que estos problemas también pueden conducir a tasas más altas de resultados adversos en el nacimiento y anomalías congénitas, así como fallos en los tratamientos de reproducción asistida, incluso cuando los parámetros del semen son normales (normozoospermia) (Sikka y Hellstrom, 2016).

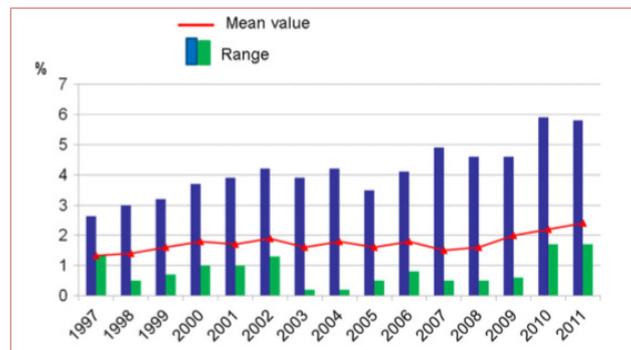


Figura 1: Incremento de los nacimientos de niños concebidos mediante Técnicas de Reproducción Asistida a lo largo del tiempo. La línea roja representa la media anual que contempla datos de todos los países registrados; en las columnas, los valores máximos representados en azul y los valores mínimos representados en verde que se registraron cada año en dichos países. (Ferraretti *et al.*, 2017)

1.2 Criopreservación

Dentro del campo de las TRA, desde la introducción del glicerol como agente crioprotector, son muchos los tipos celulares que han sido preservados, haciendo posible criopreservar gametos femeninos y masculinos así como organismos pluricelulares de mayor complejidad como embriones.

De este modo, la criopreservación de espermatozoides adquiere un papel fundamental en la preservación de la fertilidad tanto para TRA como en los casos de criopreservación terapéutica de espermatozoides previa a tratamientos esterilizantes y/o genotóxicos como la cirugía, la quimio y la radioterapia.

La criopreservación se puede definir como el procedimiento por el cual se puede realizar la preservación y el almacenamiento a largo plazo de células a temperaturas criogénicas (-196°C) consiguiendo mantener la viabilidad celular gracias a la inactivación de los procesos de envejecimiento y degeneración celulares. Sin embargo, esta técnica requiere la utilización de agentes crioprotectores y la temperatura óptima de enfriamiento varía dependiendo de la naturaleza del tipo celular, y está relacionada con las propiedades de membrana específicas para cada caso (Sieme *et al.*, 2016), tal y como se refleja en la Figura 2.



Figura 2: Esquema del procedimiento general empleado en la criopreservación espermática (OVODONANTE, 2016)

Así pues, la preservación de la fertilidad se presenta como una gran oportunidad para pacientes con enfermedades de tipo crónico, como la esclerosis múltiple (Auger *et al.*, 2016) o de tipo oncológico. En consecuencia, con el creciente número de pacientes con cáncer que logran superar la enfermedad con éxito, mantener la calidad de vida a largo plazo se ha convertido en un tema importante, ya que permite la preservación de su potencial reproductivo (Wallace *et al.*, 2005). Para ello, la criopreservación de semen es el único método disponible en el momento actual para preservar la fertilidad en hombres jóvenes y adultos y la congelación es la primera opción para ello.

Entre los métodos que pueden ser empleados, la congelación lenta se usa comúnmente para la criopreservación de espermatozoides eyaculados o recuperados quirúrgicamente (previo al tratamiento de radioterapia, quimioterapia, vasectomía u otros procedimientos que puedan causar daño irreversible a las gónadas masculinas) (Lin *et al.*, 1998) o para su almacenamiento en bancos de donantes, convirtiéndose así en una parte imprescindible de las Unidades de Reproducción Humana.

De manera análoga, también debe considerarse en casos de azoospermia, para evitar someter al paciente a técnicas quirúrgicas de forma repetida para la recuperación de espermatozoides, como biopsias testiculares o aspiraciones de epididímo o bien en pacientes que presentan parámetros alterados del semen, como en los casos de pseudo-azoospermias y criptozoospermias para asegurar la disponibilidad de muestra con la calidad suficiente para ser utilizada en TRA (Palomar y Molina, 2017).

Desafortunadamente, la criopreservación de muestras de semen ocasiona un gran impacto en la calidad de las muestras descongeladas, donde una amplia gama de parámetros característicos del esperma se cree que se ven afectados por el proceso de congelación/ descongelación (Palomar y Molina, 2017). Además, pese a que teóricamente se inactiva la degeneración celular, de acuerdo con los estudios de Honda y colaboradores (2001), durante la criopreservación tiene lugar un acortamiento de los telómeros así como una inducción a la senescencia celular.

Asimismo, en el proceso de la criopreservación, se observa una disminución drástica en la viabilidad de los espermatozoides descongelados, causada por el daño originado por la formación de hielo intracelular (durante la congelación rápida), y el estrés osmótico causado por la formación de hielo extracelular (durante la congelación lenta). En este último proceso, los agentes crioprotectores aumentan la concentración de soluto en el medio extracelular, promoviendo la salida de agua de la célula para mantener el equilibrio osmótico, formándose hielo en el espacio extracelular. Y aunque esta deshidratación pueda evitar la formación de cristales de hielo intracelulares, si se excede la tolerancia osmótica, las consecuencias podrían ser letales para los espermatozoides. Según los estudios de Sieme *et al.* (2016) la deshidratación celular y la lesión osmótica ocurren cuando se emplean bajas velocidades de enfriamiento, mientras que a altas velocidades, la deshidratación celular no se completa lo suficiente, por lo que todavía hay agua líquida dentro de las células espermáticas, causando la formación de cristales de hielo intracelulares y teniendo como consecuencia el daño comentado previamente. No obstante, una vez se ha alcanzado la temperatura deseada y las células se encuentran ya congeladas en nitrógeno líquido, todos estos procesos que causan daño celular se estabilizan, dejando de incrementarse estos daños con independencia del tiempo de almacenamiento (Palomar y Molina, 2017; Honda *et al.*, 2001)

Posteriormente, en el proceso de descongelación será necesario tener en consideración que además de la eliminación de los agentes crioprotectores tendrá lugar la rehidratación celular. Para ello, la eliminación de estos agentes se realiza gradualmente, evitando el choque osmótico.

De este modo, se concluye que el estrés osmótico sufrido por los espermatozoides durante la criopreservación es el resultado del proceso de congelación/descongelación en sí mismo. Aunque también intervienen procesos como la adición y eliminación de los crioprotectores, y se discute sobre si la temperatura de adición de los mismos afecta a los resultados y a su toxicidad sobre las células. (Sieme *et al.*, 2016; Hoffman *et al.*, 2011)

Por otro lado, la disminución de la temperatura en el proceso de congelación conduce a la peroxidación de lípidos, causando la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), originando con ello estrés oxidativo celular. También se destaca una reducción de la motilidad y de la capacidad fecundante de los espermatozoides así como daños en la membrana plasmática y en el acrosoma observables a microscopía electrónica. Del mismo modo, se ha observado que la criopreservación de espermatozoides puede favorecer su proceso apoptótico, y que puede conllevar un descenso del metabolismo celular y fallos bioenergéticos relacionados con procesos mitocondriales, todo ello se traduce en un descenso de su motilidad y también en un aumento de anomalías en la morfología del espermatozoide. No obstante, se siguen planteando ciertas dudas sobre la implicación de estos daños ocasionados sobre la membrana celular en la disminución de la motilidad de los espermatozoides criopreservados (Palomar y Molina, 2017; Lin *et al.*, 1998).

A pesar de todos estos efectos adversos, la criopreservación de semen ofrece ventajas sobre el uso de las muestras en fresco en los programas de inseminación con muestras de donantes, incluida la facilidad de uso, la garantía de la disponibilidad durante un período prolongado de tiempo y la posibilidad de descartar la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), entre otras enfermedades (Lin *et al.*, 1998).

1.3 Agentes crioprotectores

Como ya se ha comentado anteriormente, para llevar a cabo el proceso de la congelación de espermatozoides se requiere de agentes crioprotectores, que se pueden clasificar en permeables y no permeables. Aquellos capaces de atravesar la membrana plasmática de la célula, o permeables, generalmente son pequeñas moléculas no iónicas. Los más empleados son el dimetil sulfoxido (DMSO) y el glicerol. Son osmóticamente inactivos y se distribuyen equilibradamente en los espacios intracelular y extracelular. De los efectos mencionados previamente, la adición de estos compuestos promueve una contracción celular, seguida de la afluencia tanto de agua como de agentes crioprotectores hasta que se alcanza el equilibrio intra y extracelular de agua/crioprotector.

En cuanto a los agentes no-permeables, se pueden distinguir sustancias osmóticamente activas como los disacáridos (sacarosa, trehalosa) o inactivas como polisacáridos (maltodextrina) o proteínas (albúmina). Estos compuestos favorecen la deshidratación celular ya que aumentan la osmolalidad del medio, puesto que no son capaces de atravesar la membrana plasmática de los espermatozoides.

En el caso de las muestras de semen, los reactivos para la criopreservación contienen nutrientes (sales, azúcares, proteínas y lípidos) y, por lo general, glicerol como principal agente crioprotector. Sin embargo, otros agentes crioprotectores permeables tales como el etilenglicol y la di-metilformamida, o diversas combinaciones de estos crioprotectores han demostrado tener resultados de criosupervivencia similares o incluso superiores (Sieme *et al.*, 2016).

Asimismo, aunque se ha tratado de encontrar alternativas por su composición indefinida y origen animal, con frecuencia se emplea la yema de huevo como agente crioprotector por su efecto protector sobre la membrana del espermatozoide durante el proceso de la congelación. Este componente actúa como reserva de fosfolípidos y colesterol, lo que permite la reposición adecuada de los lípidos perdidos durante el proceso de congelación y descongelación en la membrana del espermatozoide. Su composición alberga ciertos riesgos de transmisión de enfermedades infecciosas animales, tales como el virus de la influenza aviar, salmonelosis, la encefalopatía espongiiforme bovina o la transmisión de priones en el caso del suero de albúmina bovina (BSA). Además, su composición no está estandarizada por lo que se pueden encontrar variaciones entre distintos lotes. Por lo tanto, el uso de medios que no contengan productos animales sería ventajoso, ya que aumentaría la fiabilidad en cuanto a su composición y menor riesgo de contraer enfermedades (Tiwari *et al.*, 2017). Entre las alternativas, se destaca el uso de liposomas o complejos de ciclodextrina-colesterol (Sieme *et al.*, 2016).

1.4 Parámetros espermáticos

1.4.1 Motilidad espermática

Así pues, tal y como se ha expuesto previamente, los efectos de la congelación de espermatozoides se manifiestan fundamentalmente en la disminución de la motilidad tras la descongelación. La evaluación de la motilidad espermática se realiza mediante un recuento de los espermatozoides presentes en distintos campos de una cámara Mackler de conteo (Figura 3) y se consideran tanto los espermatozoides móviles como los inmóviles. Pueden manifestar tres tipos de motilidad según los criterios establecidos por la OMS (2010), que se agrupan en dos categorías principales: motilidad progresiva (tipos a y b) y no progresiva (tipo c). Así pues, la motilidad total (MT) incluye a la motilidad progresiva y no progresiva (MP y MNP).

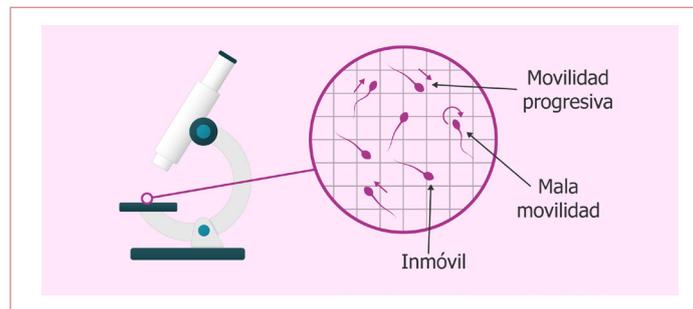


Figura 3: Representación de los tipos de motilidad espermática visualizados empleando una cámara Mackler (OVODONANTE, 2017a)

El diagnóstico rutinario del semen se basa principalmente en la motilidad progresiva del esperma debido a la dificultad para detectar espermatozoides no progresivos en la cámara tradicional de Mackler. (Palomar y Molina, 2017) De este modo, la OMS clasifica como “tipo a” a aquellos espermatozoides que avanzan con una velocidad de al menos $25 \mu\text{m s}^{-1}$ y de forma rectilínea y rápida; como “tipo b” a los que avanza con más de $5 \mu\text{m s}^{-1}$ pero $<25 \mu\text{m s}^{-1}$, siguiendo una trayectoria más sinuosa; como “tipo c” o “no progresivo” a aquellos que se mueven $<5 \mu\text{m s}^{-1}$; y como “inmóvil” o de “tipo d” a aquellos que no se mueven (Sikka y Hellstrom, 2016). La motilidad espermática se ve afectada por los procesos de congelación y descongelación, como se ha mencionado previamente y además se cree que esta alteración de la motilidad podría estar asociada a daños en la función mitocondrial que generarían una disminución de la población de mitocondrias funcionales y por tanto, de su actividad (O’connell *et al.*, 2002).

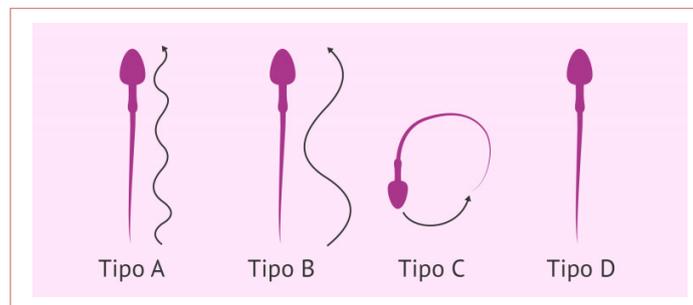


Figura 4: Tipos de motilidad espermática existentes (OVODONANTE, 2017b)

Además de la congelación, la motilidad de los espermatozoides se ve afectada por la técnica de selección espermática utilizada para las distintas TRA. La importancia de la capacitación espermática radica en que en algunos casos la congelación se realiza tanto en muestras frescas como capacitadas. Para la capacitación espermática se utiliza fundamentalmente la técnica de 'swim up'. Con esta técnica podemos obtener un rendimiento muy alto (>90%) de selección de espermatozoides morfológicamente normales con motilidad progresiva. Se busca este tipo de movimiento ya que los espermatozoides humanos durante la penetración de la barrera cervical femenina, tienden a generar fuerzas de propulsión, es decir, trayectorias lineales y progresivas. Estos atributos de movimiento específicos (velocidad promedio, rectitud, y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide), incluidos los criterios de análisis convencionales (recuento de espermatozoides y morfología) se consideran características de la calidad del semen que pueden facilitar la penetración de la barrera cervical y por tanto fecundidad de la muestra (Jameel, 2008).

La eficacia de ésta técnica radica en la superficie del sedimento o pellet que se obtiene al centrifugar inicialmente la muestra, así como en la motilidad inicial de la muestra en fresco. En este sentido, aquellos espermatozoides que se queden en las capas más inferiores del pellet podrán ser potencialmente móviles pero nunca alcanzarán la fracción superior del medio del cultivo, en caso de encontrar un elevado número de capas en el sedimento. Para evitarlo se emplean tubos con una terminación redondeada, optimizando así el área de superficie de la interfaz entre el eyaculado y el medio de cultivo. Asimismo, se obtiene una recuperación máxima mediante el uso de múltiples tubos con pequeños volúmenes de semen en cada uno de ellos, lo que maximiza el área total combinada de la interfaz entre el semen y el medio de cultivo (Jameel, 2008).

Uno de los principales inconvenientes a la hora de evaluar la motilidad tanto en las muestras frescas como capacitadas es la elevada subjetividad tanto intra como inter observador. No obstante, todas estas medidas se realizan mediante microscopía por personal entrenado, pero pese a ello, siempre existe cierta subjetividad que, en la actualidad, se está tratando de resolver mediante el uso de analizadores automáticos. El sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analyzer) aporta más información sobre la cinética de la muestra, permitiendo un análisis más objetivo.

Actualmente este analizador proporciona información útil para garantizar la calidad de la muestra y para trabajos de investigación. Entre los distintos softwares disponibles, la mayoría establece un punto central para cada espermatozoide y evalúa el movimiento celular en función de su trayectoria (Amman y Wabersky, 2013).

Además de aportar información acerca de los parámetros cinéticos relacionados con la velocidad y trayectoria del espermatozoide en función del tiempo, se obtiene el porcentaje de espermatozoides progresivos rápidos (motilidad tipo a), progresivos lentos (motilidad tipo b), no progresivos (motilidad tipo c) y estáticos (tipo d). Sus principales ventajas son que permite un análisis objetivo de la motilidad de los espermatozoides en las muestras, y que se pueden emplear los mismos parámetros en el análisis de distintas muestras en serie (Sikka y Hellstrom, 2016; Broekhuijse, 2011).

No obstante, si el análisis de motilidad de una muestra se realiza manualmente, como ocurre en la mayor parte de los laboratorios de FIV, no se podrá determinar de forma exacta qué porcentaje de espermatozoides presentan un movimiento de tipo no progresivo, mientras que con el uso del sistema CASA se obtiene un resultado más objetivo, ya que sí que considera éste tipo de movimiento. Por esta razón, la utilización del CASA está especialmente recomendada en el caso de proyectos de investigación ya que va a permitir eliminar la subjetividad tanto intra como extra observador lo que conducirá a la obtención de resultados más concluyentes.

1.4.2 Concentración espermática

Por otra parte, la concentración espermática es según Sikka y Hellstrom (2016) el parámetro más importante de disfunción testicular. De la misma forma que la motilidad, son muchos los factores que pueden afectar al número total de espermatozoides en la muestra, como la recolección incompleta del eyaculado, la menor duración del período de abstinencia, u otros factores externos que pueden influir, por ejemplo, fiebre, ingesta de medicamentos, etc. (Sikka y Hellstrom, 2016).

El recuento total de espermatozoides es una medida relevante, sobre todo cuando se reduce la disponibilidad de muestra debido a una disminución del volumen del eyaculado. Los valores de referencia según la OMS del 2010 consideran como normales aquellos volúmenes de eyaculados mayores y/o iguales a 2 ml. El recuento total de espermatozoides (RTE) se obtiene al multiplicar la concentración de espermatozoides por el volumen de la muestra, y es de gran utilidad tanto para el diagnóstico como para la indicación de un tratamiento de reproducción asistida, ya que indica la cantidad total de espermatozoides potencialmente funcionales que podrían estar disponibles. El recuento total de espermatozoides móviles (RTEM), por otro lado, combina la motilidad y concentración espermática y se ha sugerido que es relevante para obtener mejores resultados reproductivos (Palomar y Molina, 2017).

1.4.3 Morfología

Del mismo modo, la morfología espermática es un parámetro importante de la evaluación del semen para la identificación de la infertilidad causada por el factor masculino. En esta técnica se distinguen las tres regiones del espermatozoide (cabeza, pieza intermedia y cola), determinando mediante distintas tinciones si la proporcionalidad entre ellas es 'normal' o 'anormal'.

Actualmente según la OMS del 2010 una muestra se considera morfológicamente normal si el recuento de formas normales es igual o superior al 4%; mientras que en ediciones anteriores (OMS 1992) se considerarían valores superiores al 30%, tal y como recoge la Tabla 2. Estos datos reflejan cómo el punto de corte para que una muestra de semen sea considerada normal en cuanto a la morfología ha ido variando a lo largo de los años haciéndose progresivamente menos restrictivo.

Debido a esta disparidad, no existe un estándar universal; lo que unido a la dificultad de la técnica y el tiempo que ésta requiere induce a que carezca del peso que podría llegar a tener en la clínica (Sikka y Hellstrom, 2016).

1.4.4 Viabilidad espermática

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la vitalidad de los espermatozoides se refleja en la proporción de espermatozoides que están 'vivos', atendiendo a la facultad de la membrana plasmática de excluir colorantes o, en condiciones hipoosmóticas, su capacidad osmorreguladora.

Actualmente, según los parámetros de la OMS (2010) se considera que el parámetro de la vitalidad es relevante cuando la muestra presenta <35 % de espermatozoides móviles. Asimismo, se destaca que la proporción de espermatozoides vivos debería ser mayor que la proporción de aquellos que están vivos y que presentan motilidad (Sikka y Hellstrom, 2016). No obstante, tal y como recoge la Figura 3, se acepta como normozoospermica una muestra cuyo índice de vitalidad sea superior o igual al 58%.

En este sentido, se han desarrollado distintas pruebas para evaluar la integridad funcional y estructural de la membrana plasmática espermática. Estas técnicas se engloban bajo el nombre de técnicas de

vitalidad espermática y, en concreto, la OMS incluye tanto el HOS-test como el test de la eosina para su evaluación.

El test de la eosina se desarrolló en base a que la falta de motilidad no implica la muerte espermática (Burgos y Di Paola, 1951). Esta técnica se basa en que las células con membranas plasmáticas que hayan sufrido daños y, por tanto, presuntamente sean espermatozoides muertos, se colorearán con tinciones supravitales, como la eosina, mientras que las células no dañadas o vivas no se teñirán, dado que sus membranas excluirán activamente el colorante (eosina). De este modo, este test permite diferenciar entre espermatozoides inmóviles vivos y muertos, mediante la tinción de la región de la cabeza (Lin *et al.*, 1998). De esta forma, los espermatozoides vivos presentarán sus cabezas blancas o rosadas mientras que los muertos se distinguirán por presentar un color rojizo o rosa oscuro. Para mejorar la distinción entre células teñidas y no teñidas se puede emplear esta técnica en combinación con la nigrosina, que amplía el contraste con el fondo o background (WHO, 2010).

Por otro lado, el HOS-test fue desarrollado inicialmente como un test diagnóstico para discriminar espermatozoides viables en casos de astenozoospermia, sin embargo, actualmente permite evaluar la funcionalidad de la membrana espermática (Lechniak *et al.*, 2002). De acuerdo con los estudios de Jeyendran *et al.* (Jeyendran *et al.*, 1984), la capacidad de la cola del espermatozoide de hincharse y / o enrollarse en presencia de una solución hipoosmótica (compuesta a partes iguales de fructosa y citrato de sodio) demuestra que el flujo de agua a través de la membrana plasmática ocurre de manera regular, proporcionando información sobre la integridad de la membrana de la cola y su funcionalidad (Figura 5) (Lin *et al.*, 1998).

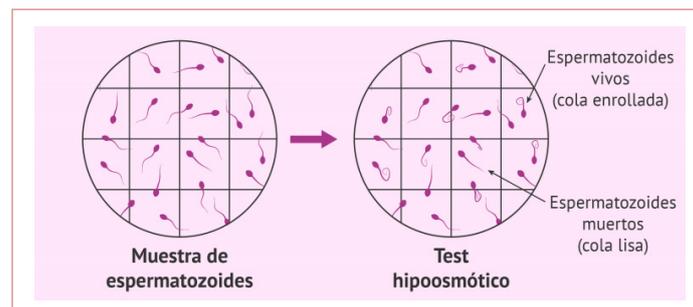


Figura 5: Representación de los cambios morfológicos del espermatozoide humano sujeto a estrés hipo-osmótico (OVODONANTE, 2017c)

No obstante, de acuerdo con la OMS, este test no debería ser utilizado como test de funcionalidad sino como test de vitalidad espermática. Cabe destacar que ya ha sido empleado para seleccionar espermatozoides que presentaban una membrana intacta dentro de un conjunto de espermatozoides inmóviles (Lin *et al.*, 1998). De este modo, el HOS-test se ha convertido en una alternativa al uso de tinciones supravitales a la hora de seleccionar espermatozoides viables para su uso en ICSI (Hossain *et al.*, 2010).

De este modo, la OMS del 2010 ha establecido una clasificación de las muestras seminales en función de su motilidad, concentración y morfología (Tabla 2). Según esta clasificación, un recuento normal (> 15 millones spz/ml) es normozoospermia, un recuento bajo (< 15 millones spz/ml) es oligozoospermia, la ausencia de espermatozoides en el eyaculado se denomina azoospermia, baja motilidad (<40 % motilidad progresiva) es astenozoospermia, morfología deficiente (> 4% de morfología aberrante) es teratozoospermia y la combinación de valores de concentración, motilidad y morfología inferiores a los valores normales se considera como una muestra oligoastenoteratozoospermia, pudiendo indicar a su vez todas las combinaciones existentes entre los tres parámetros (concentración-motilidad-morfología).

No obstante, estos límites no son del todo determinantes ya que existen varones que a pesar de los parámetros de referencia son fértiles o infértiles, mostrando valores más bajos o más altos a los anteriormente indicados (Sikka y Hellstrom, 2016).

Tabla 2: Valores de referencia en el diagnóstico espermático propuestos por la OMS en distintos períodos. (Sikka y Hellstrom, 2016).

<i>Semen characteristics</i>	<i>WHO 1980 1st</i>	<i>WHO 1987 2nd</i>	<i>WHO 1992 3rd</i>	<i>WHO 1999 4th</i>	<i>WHO 2010* 5th</i>
Volume (ml)	ND	≥2	≥2	≥2	1.5
Sperm count (10 ⁶ ml ⁻¹)	20–200	≥20	≥20	≥20	15
Total sperm count (10 ⁶)	ND	≥40	≥40	≥40	39
Total motility (% motile)	≥60	≥50	≥50	≥50	40
Progressive motility ^f (%)	≥2 ^f	≥25	≥20 (Grade a)	≥25% (Grade a)	32 (Grade a + b)
Vitality (% alive)	ND	≥50	≥75	≥75	58
Morphology (% normal forms)	80.5	≥50	≥30 ^g	14 ^h	4 ⁱ
Leukocyte count (10 ⁶ ml ⁻¹)	<4.7	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0

Justificación y objetivos

2. Justificación y objetivos

Los bancos de semen son imprescindibles en cualquier programa de reproducción asistida con el fin de almacenar muestras de varones para su posterior utilización en TRA. En su congelación es necesario recurrir a la utilización de crioprotectores (CP) para disminuir los daños producidos por los cristales de hielo intracelular. Sin embargo, estos CP pueden presentar efectos tóxicos, sobre todo aquellos que son permeables y, por tanto, capaces de penetrar en el interior de la célula.

En la bibliografía consultada se ha encontrado un gran número de trabajos que utilizan distintas variables para evaluar el éxito tras la descongelación utilizando distintos CP. A pesar de este gran número de variables, y en el caso concreto de la congelación de espermatozoides humanos, lo más importante es conseguir el mayor número posible de espermatozoides vivos tras la descongelación para su posterior microinyección, ya que en los casos en los que se utiliza semen propio descongelado de varones oncológicos o pseudoazoospermicos la TRA de elección será la ICSI.

Por otra parte, existe un gran número de CP y de protocolos de congelación y descongelación de espermatozoides con obtención de resultados muy dispares en función de las variables seminales tanto de viabilidad como de cinética espermática. A pesar de ello, el mejor crioprotector será aquel que nos permita obtener un mayor número de espermatozoides móviles para su posterior microinyección, con independencia de la calidad de la motilidad (a, b y c). Los espermatozoides con motilidad no progresiva tipo c proporcionan los mismos resultados tras ICSI que los espermatozoides con motilidad lineal progresiva en términos de TF, TG y TI. Por otra parte, de todos los ensayos utilizados para evaluar la viabilidad de los espermatozoides tras su descongelación, solo el HOS-test nos proporciona información de la viabilidad de los espermatozoides al mismo que nos permite su posterior microinyección. Considerando que aquellos espermatozoides vivos (viables) serán los que presenten algún tipo de motilidad, los resultados del HOS-test deberían estar correlacionados con la motilidad total de la muestra más que con la motilidad lineal progresiva.

En el presente trabajo se ha evaluado la relación entre motilidad progresiva y total de forma automática y la viabilidad mediante dos técnicas distintas (HOS-test y eosina). El parámetro que más se ajusta en la medición de espermatozoides vivos es la motilidad total, puesto que medida con el analizador automático es más fiable y objetiva. Por tanto, aporta mayor solidez al estudio de la evaluación de toxicidad de los distintos crioprotectores que los test de vitalidad (HOS-test y eosina).

Por lo tanto, los objetivos planteados son:

- Establecer las correlaciones existentes entre la motilidad total, la motilidad progresiva el HOS-test y el test de la Eosina como variables que nos permitan evaluar de forma fiable los resultados obtenidos tras la descongelación de espermatozoides.
- Evaluar la toxicidad de distintos CP a distintas concentraciones con el fin de optimizar los protocolos de congelación de espermatozoides humanos en las unidades de reproducción humana asistida.

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1 Obtención de muestras

Para la realización de este trabajo se han empleado un total de 85 muestras de semen fresco y capacitado procedentes de los diagnósticos realizados en el laboratorio de andrología de la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitario y Politécnico la Fe de Valencia, durante los meses de octubre de 2017 a mayo de 2018.

Estas muestras fueron recogidas mediante masturbación tras un período de abstinencia de entre 3 y 5 días. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente hasta su análisis en contenedores estériles. Todas las muestras fueron procesadas antes de una hora después de su llegada al laboratorio. Tras la licuefacción de las muestras, las muestras seminales fueron evaluadas de acuerdo a los criterios de la OMS del 2010. Aquellas que fueron clasificadas como normozoospermicas, se emplearon para los experimentos realizados en el presente trabajo.

3.2 Ensayo de obtención del modelo viabilidad-motilidad

En primer lugar, para la realización del ensayo de obtención del modelo de viabilidad-motilidad se emplearon un total de 60 muestras (frescas y sus respectivos capacitados), analizando su motilidad mediante el analizador automático de espermatozoides (CASA) y su vitalidad mediante el HOS-test así como mediante tinción por eosina.

3.2.1 Capacitación espermática

La capacitación se realizó mediante la técnica de swim-up, siguiendo el protocolo estándar. Esta técnica consiste en seleccionar a los espermatozoides en función de su motilidad, en concreto, su capacidad para ascender hasta la fase superior del medio de cultivo, tal y como se refleja en la Figura 6. Para ello, en primer lugar se mezcla el eyaculado con medio de lavado. Una vez obtenida la alícuota de semen fresco, se añadió medio de lavado (Flushing Medium, Irvine Scientific, USA) (v/v), dividiendo el volumen total en dos tubos cónicos. A continuación se realizó un paso de centrifugación (300g, 10 min), retirando el sobrenadante y el pellet se incubó con un volumen total de 0.1 ml (50 ul a cada tubo cónico) de medio de cultivo (IVF, Irvine Scientific, USA) durante 45 minutos en el incubador (Labotect C200, Labor-Technik-Göttingen, Germany) (37°C y 5% CO²).

Durante el periodo de incubación los espermatozoides más móviles migran del pellet a la fracción superior del medio de cultivo que los cubre, de forma que es posible seleccionar aquellos que presentan mejor motilidad progresiva.

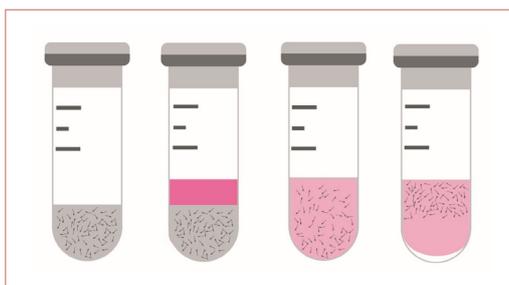


Figura 6: Procedimiento esquemático seguido en el protocolo de capacitación por Swim Up

3.2.2. Evaluación de la motilidad automática progresiva y total (CASA)

Una vez finalizado el periodo de incubación, se recuperó la fracción enriquecida en espermatozoides hiperactivados que presentaban una motilidad lineal progresiva rápida. A continuación se realizaron análisis de recuento y motilidad, empleando para ello el analizador automático de espermatozoides, ilustrado en la Figura 7. Como se ha mencionado previamente, para evitar el posible error asociado al diagnóstico manual se emplean distintos softwares que realizan el recuento de los parámetros deseados, como por ejemplo concentración, motilidad o morfología, de forma automatizada, aumentando la objetividad y la calidad de la medición. En nuestro caso se empleó un microscopio de contraste de fases acoplado al software ISAS (version 1.2; Número de serie 0030149D) basado en el sistema CASA (Computer Assisted Semen Analyzer), que determina la trayectoria y el movimiento del espermatozoide midiendo los patrones de movimiento de la cabeza en 2 dimensiones (Khatun *et al.*, 2018).



Figura 7: dispositivos empleados para el estudio de motilidad y concentración (Sperm-track, microscopio de contraste de fases, cámara, ordenador y software de análisis)

Para realizar cada medición se empleó una cámara de conteo específica para este procedimiento (Spermtrack) que se mantuvo a 37°C antes de cargar la muestra para evitar que se produjera un shock térmico. Asimismo, la pletina del microscopio empleado estaba también calefactada para mantener la temperatura de la muestra, evitando que descendiese su motilidad por los cambios de temperatura asociados a este proceso. La cámara de conteo se cargó con 10ul de muestra y se analizó para cada caso (cada muestra en fresco y en capacitado).

De este modo, se realizaron medidas de concentración, expresadas en millones de espermatozoides por ml ($\times 10^6/\text{ml}$), y de los distintos tipos de motilidad, de acuerdo con los parámetros establecidos por la OMS del 2010 previamente comentados. Para ello se empleó el objetivo de 10x tratando de capturar distintas zonas de la misma muestra, calculando la media de los distintos parámetros observados en los distintos campos. Se distinguió de esta forma entre motilidad tipo d (inmóviles), tipo c (no progresiva) y tipo a y b (progresiva: rápida y lenta, respectivamente).

Con estos datos se recogió la concentración, motilidad lineal progresiva (a+b) y motilidad total (a+b+c) de las muestra en fresco y capacitadas.

3.2.3 Evaluación de la vitalidad espermática mediante el HOS-test

El HOS-test es un test de viabilidad complementario al conteo de espermatozoides móviles que también se ha realizado en este estudio. En esta técnica se considera que un espermatozoide está vivo si se existe un hinchamiento en la zona de la cola, observándose cualitativamente mediante su enrollamiento. De esta manera, es posible diferenciar un espermatozoide vivo inmóvil de uno muerto.

Esta técnica se basa en el principio de la semipermeabilidad de la membrana plasmática intacta. El influjo de agua que se produce al exponer a los espermatozoides a un medio hiposmótico, produce la entrada de agua desde el exterior al interior de la célula para conseguir el equilibrio osmótico, lo que provoca la hinchazón de las células por expansión del volumen celular. El fenómeno de la entrada de agua y el aumento de volumen de la célula solamente se da en los espermatozoides que presenten una membrana plasmática íntegra, por lo que será en estos espermatozoides vivos en los que se produzca el enrollamiento de la cola. Por lo tanto, aquellos espermatozoides inmóviles que presenten colas hinchadas serán espermatozoides vivos. El HOS-test es el único test de viabilidad espermática que distingue los espermatozoides inmóviles vivos de los muertos y permite su posterior utilización en TRA.

La solución hiposmótica se consiguió disolviendo 0.735 gramos de citrato de sodio dihidratado y 1.351 gramos de D-fructosa en 100 mililitros de agua purificada. Se congeló la solución en alícuotas de 1 ml a -20°C hasta su uso.

El protocolo del HOS-test según la OMS de 2010 recomienda descongelar la solución y mezclarla bien antes de su uso. Una vez se atemperó la muestra a 37°C, se añadieron 100 ul del semen en la alícuota de solución hiposmótica, se homogenizó bien con la ayuda de una pipeta y posteriormente se incubó a 37°C durante 30 minutos. Tras la incubación se colocaron 10 ul de la muestra en un portaobjetos de 75x25mm (Knittel Glass, Germany) y se cubrió con un cubreobjetos de 22x22 mm (Knittel Glass, Germany). Se observó al microscopio a x200 o x400 aumentos (Figura 8).

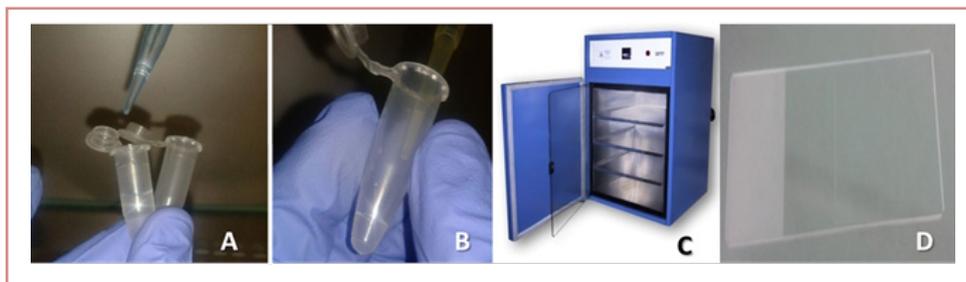


Figura 8: A. 100 ul de la solución hiposmótica se transfieren a un vial eppendorf. B. Mezcla de 10 ul de muestra con los 100 ul de la solución hiposmótica. C. Incubación a 37°C y 5% CO₂. D. Cargar 10 ul de la mezcla en un portaobjetos y cubrir con cubreobjetos. Observar la muestra al microscopio a 200 o 400 aumentos.

Se evaluaron 200 espermatozoides por muestra, considerándose aquellos espermatozoides que tengan la cola enrollada como vivos y los que no como muertos. Se calculó el porcentaje de espermatozoides vivos de la muestra. En presencia de la solución hiposmótica se pueden diferenciar varios patrones de enrollamiento de colas aunque claramente se diferencian aquellos espermatozoides no viables que no presentan cola enrollada (Figura 9).

De este modo se evaluó el resultado como índice de viabilidad (Fórmula 1) , donde se hace referencia al porcentaje de espermatozoides que están vivos sobre el total atendiendo al enrollamiento de la cola.

$$\text{Índice de Vitalidad (HVI)} = \frac{\text{Recuento spz viables}}{\text{Recuento spz totales}} \times 100$$

Fórmula 1: Índice de vitalidad en base al recuento de espermatozoides viables y no viables atendiendo al HOS-test (HVI, HOS-test Vitality Index)

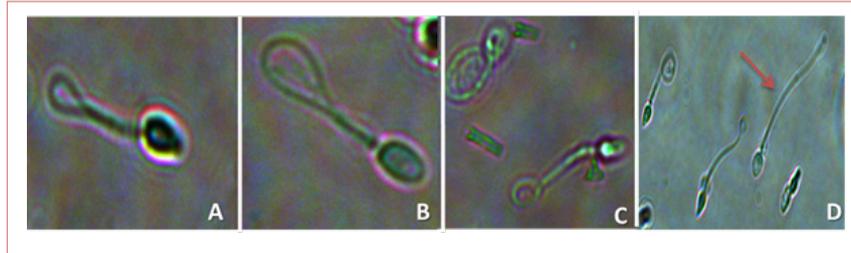


Figura 9: Diferentes patrones de hinchazón de la cola debido a la presencia de los espermatozoides en una solución hiposmótica. A, B y C. Distintos espermatozoides con el mismo patrón de cola enrollada (espermatozoides vivos). D. Espermatozoide que no presenta enrollamiento, espermatozoide muerto (señalado con la flecha) y 3 espermatozoides con diferentes patrones de enrollamiento de cola

3.2.4 Evaluación de la vitalidad espermática mediante el test de la Eosina

El segundo test de vitalidad estudiado consiste en una tinción supravital con eosina-Y, donde, como se ha comentado previamente, las células cuyas membranas celulares están dañadas (muertas) son permeables al colorante mientras que las células sin dañar (vivas) lo excluyen (Figura 10). El procedimiento seguido fue acorde a las recomendaciones de la OMS (2010).

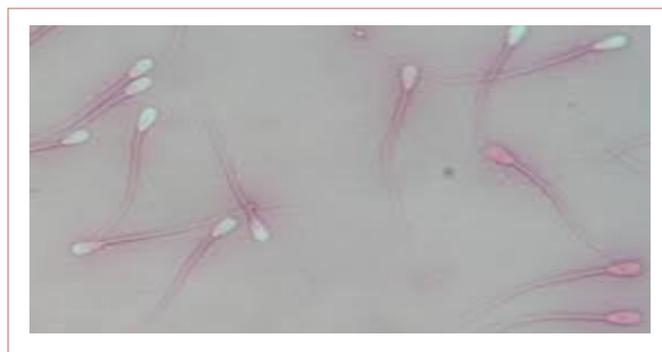


Figura 10: Extensión de muestra sometida a la solución de eosina. Se observan espermatozoides teñidos y refringentes. (Melliso E., 2010)

Para ello, se empleó una solución de eosina al 1% (Eosin Yellowish solution 1%, PanReac Applichem). Se preparó una alícuota de 5ul de cada muestra y se mezcló sobre un portaobjetos de 75x25mm (Knittel Glass, Germany) mediante re-suspensión con una alícuota de eosina-Y de 5 ul (v/v). Se realizó la extensión y se protegió mediante un cubreobjetos de 22 x 22 mm (Knittel Glass, Germany), dejándolo reposar unos segundos, para después evaluarlo al microscopio óptico de contraste de fases bajo el objetivo de 400x. Se contaron por cada muestra un total de 200 espermatozoides, pudiendo diferenciar los espermatozoides vivos (no teñidos) de los espermatozoides muertos (teñidos).

El resultado, de la misma forma que con los resultados del HOS test, se muestra como porcentaje de viabilidad, que hace referencia el número de espermatozoides que están vivos sobre el total, donde:

$$\text{Índice de Vitalidad (EVI)} = \frac{\text{Recuento spz viables}}{\text{Recuento spz totales}} \times 100$$

Fórmula 2: Índice de vitalidad en base al recuento de espermatozoides viables y no viables atendiendo al test de la Eosina (EVI, Eosin test Vitality Index)

3.3 Ensayo de toxicidad

Para realizar el ensayo de toxicidad se dispuso de 25 muestras capacitadas, obtenidas empleando la técnica de swim up previamente descrita.

Se testaron diferentes crioprotectores en distintas condiciones de incubación a partir de distintas alícuotas de una misma muestra capacitada.

Con el objetivo de destacar la acción que ejercen estos compuestos sobre la motilidad de la muestra, en primer lugar, se analizaron cada una de las muestras mediante el analizador automático, obteniendo su concentración y motilidad, como se ha descrito anteriormente.

Para estandarizar el proceso se seleccionaron aquellas que presentaban una concentración superior o igual a 20 millones de espermatozoides. A continuación cada muestra fue alícuotada y se sometió a cada una de estas fracciones a un compuesto distinto, midiendo de nuevo su motilidad a distintos tiempos (10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 24 horas), tal y como se ilustra en la Figura 11.

De esta forma, de cada muestra se obtuvieron 5 fracciones del mismo volumen. A una de ellas se le agregó medio de cultivo (v/v) (IVF, Irvine Scientific, USA). Este fue considerado como nuestro grupo control, dada su inocuidad sobre la muestra.

A la segunda y tercera alícuota de muestra se les adicionó Test Yolk Buffer (TYB, Irvine Scientific, USA), un crioprotector con componentes de origen animal que contiene yema de huevo, glicerol y gentamicina. En el caso de la segunda fracción se añadió volumen a volumen (v/v), mientras que en el caso de la tercera se sumó al volumen de la muestra el doble de volumen de TYB (v/2v). Este crioprotector, se utiliza frecuentemente en la congelación de espermatozoides para TRA.

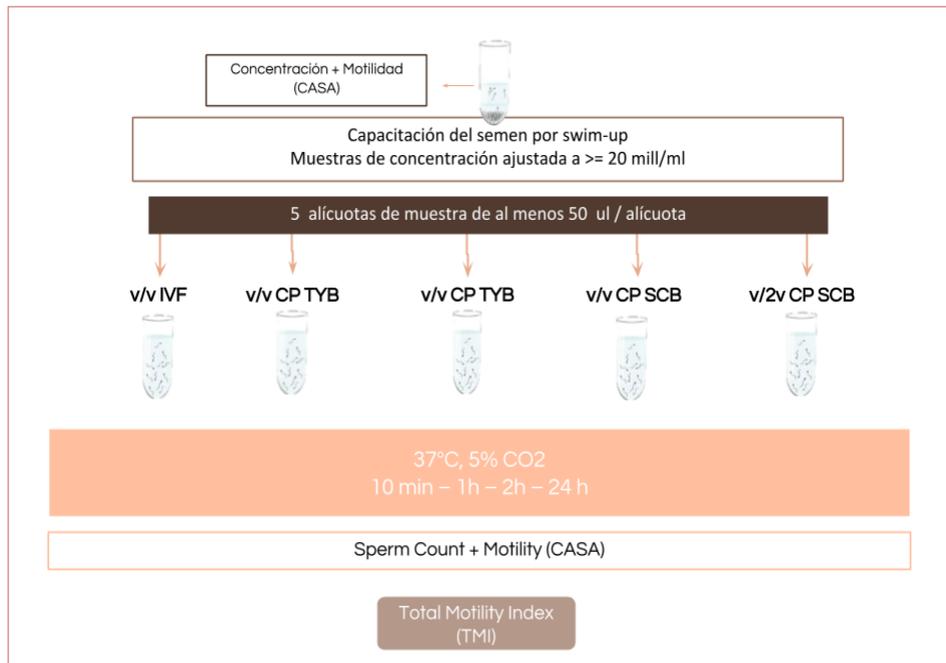


Figura 11: Esquema de los pasos llevados a cabo en el ensayo de toxicidad

Por otro lado, a la cuarta, quinta alícuota se les añadió un crioprotector sin componentes de origen animal (SCB, Sydney IVF Sperm Cryopreservation Buffer, Ref.: K-SIC-20, Cook Medical, USA) que está destinado a evitar el daño sufrido por la muestra de semen durante los procesos de crioconservación y descongelación. Este crioprotector está compuesto por medio tamponado HEPES, cuya función es ayudar a mantener el pH fisiológico; y suplementado con gentamicina (0.01 mg/mL) y seroalbúmina humana HSA (4 mg/mL).

De este modo, en la cuarta fracción se incubó la alícuota de muestra junto con el mismo volumen (v/v) de crioprotector SCB (Cook Medical, USA), mientras que la quinta se incubó el volumen de la muestra con el doble de volumen de SCB (Cook Medical, USA) (v/2v) (Figura 12).



Figura 12: Reactivos empleados en el ensayo de toxicidad: (A) Test Yolk Buffer (TYB) (IRVINE SCIENTIFIC); (B) Criopreservation Buffer (SCB), (COOK MEDICAL)

Dado que la motilidad es el parámetro del semen más influenciado por la acción de agentes externos a la muestra, en este ensayo estudiamos la toxicidad de distintos crioprotectores y medios mediante el análisis de las variaciones en esta variable.

La toxicidad de los distintos compuestos estudiados sobre la muestra fue determinada empleando el índice de toxicidad (Total Motility Index), de acuerdo con la Fórmula 3. Se obtuvo el TMI, calculado al restar el valor de motilidad total (MT) en cada alícuota (tx) respecto a la motilidad total obtenida en la misma muestra a tiempo 0 (t₀), para cada tiempo dado (30 minutos, 1 hora, 2 horas y 24 horas).

No se estudia el índice de motilidad progresiva (MP) ya que, como se comenta en el apartado de resultados y discusión, los test de viabilidad presentan un mejor ajuste con la MT que con la MP. De este modo reflejará la variación sufrida, no sólo sobre la motilidad progresiva, si no sobre el total de la misma (progresiva + no progresiva).

$$\text{Índice de Motilidad Total (TMI)} = \frac{MT(t_x) - MT(t_0)}{MT(t_0)} \times 100$$

Fórmula 3: Índice de toxicidad en base a la motilidad total (TMI, Total Motility Index)

3.4 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el programa Statgraphics. En todos los análisis realizados se ha considerado un nivel de significación estadística correspondiente a un p-valor < 0,05, a partir del cual se rechaza la hipótesis de partida y se acepta la hipótesis alternativa.

En el Experimento I, en el que se pretendía comparar los resultados del HOS-test y test de la eosina con los obtenidos a partir de la motilidad de la muestra, se llevaron a cabo regresiones lineales múltiples. En todas ellas la variable respuesta fue el resultado de viabilidad obtenido a partir del HOS-test y test de la eosina, respectivamente. Tanto la motilidad total (a+b+c) como la motilidad progresiva (a+b) se incluyeron como variables explicativas en cada una de las regresiones múltiples respectivamente junto con el tipo de muestra (en fresco o capacitada) y la interacción entre la motilidad y el tipo de muestra. El coeficiente R² y el cuadrado medio residual se tomaron como valores de referencia para la comparación de las regresiones lineales múltiples. Para establecer el mejor modelo predictivo se realizó un test de comparación de varianzas.

En el experimento II, se realizaron test ANOVA (ANAlisys Of VAriance) para cada uno de los CP testados; considerando como factor los crioprotectores y el medio control incluidos en este estudio.

3.5 Diseño experimental y variables estudiadas

En el presente trabajo se pretenden optimizar los protocolos de criopreservación de espermatozoides a través del conocimiento de las variables de motilidad y viabilidad espermática que mejor pueden predecir el resultado tras la descongelación de semen.

Asimismo, se desea evaluar la toxicidad de los crioprotectores comerciales utilizados en las unidades de reproducción asistida. Por esta razón, el diseño experimental se ha establecido en base a dos experimentos sucesivos.

El primer experimento consiste en establecer una relación entre el parámetro de la motilidad espermática junto con la viabilidad, analizada mediante el Hos-test y el test de la eosina.

Por otro lado, el segundo experimento se centra en evaluar la toxicidad sufrida por los espermatozoides en el proceso de criopreservación, al ser sometidos al efecto de los crioprotectores comerciales.

Por tanto, una vez determinada la variable que mejor predice el resultado tras la descongelación de espermatozoides se procedió a evaluar la toxicidad de los distintos crioprotectores empleados en los laboratorios de reproducción asistida.

Con todo ello, las variables estudiadas fueron:

Recuento de espermatozoides: Esta variable hace referencia a la concentración (millones/ml), considerada de forma aislada sin tener en cuenta la motilidad espermática, que presenta el eyaculado previamente a cualquier tratamiento. Esta variable se ha descrito como una variable continua por los valores que toma.

Índice de vitalidad del test de la eosina (EVI): Esta variable hace referencia al porcentaje de espermatozoides viables que se encuentran en la muestra, expresado como el porcentaje del cociente de los espermatozoides viables obtenido mediante el test de la eosina respecto del total.

Índice de vitalidad del HOS-test (HVI): Esta variable hace referencia al porcentaje de espermatozoides viables que se encuentran en la muestra, expresado como el porcentaje del cociente de los espermatozoides viables obtenido mediante el HOS-test respecto del total.

Motilidad total (motilidad a + b+ c): Es una variable continua que proporciona información acerca del porcentaje de espermatozoides con cualquier capacidad de movimiento presentes en la muestra. Así que incluye aquellos espermatozoides que presentan motilidad progresiva rápida (a), motilidad progresiva lenta (b) y motilidad no progresiva (c), es decir, aquellos espermatozoides que no son capaces de avanzar pero sí que presentan otros movimientos como cabeceo.

Motilidad progresiva (a + b): Esta variable continua solamente tiene en cuenta el movimiento de los espermatozoides que da lugar a avance, ya sea un movimiento rectilíneo y rápido (a) o un movimiento más enlentecido que describe una trayectoria más sinuosa (b). Por tanto, esta variable agrupa a las motilidades a y b descritas en la OMS del 2010.

Índice de toxicidad en base a la motilidad total (TMI): Se describe como una variable continua expresada en forma de porcentaje calculado a partir de la diferencia entre la MT observada en una muestra a un tiempo dado (tx), respecto al mismo valor a tiempo inicial (to).

Resultados y discusión

4. Resultados y discusión

4.1 Experimento I: Relación entre el parámetro de la motilidad espermática junto con la viabilidad, analizada mediante el Hos-test y el test de la eosina

Las muestras incluidas en esta sección del presente trabajo comprenden tanto muestras en fresco como muestras capacitadas, con el fin de estudiar la posible interacción que pudiera tener el tipo de muestra en la relación con la motilidad progresiva y total de la muestra y el porcentaje de viabilidad obtenido por el HOS-test y el test de la eosina.

En el caso del HOS-test, a nivel cualitativo se puede observar que en las muestras capacitadas que presentan los mayores valores de motilidad, la mayoría de espermatozoides presentan colas enrolladas, indicando un alto grado de viabilidad. Por el contrario, en las muestras en fresco, en las que la motilidad es sustancialmente menor, se pueden constatar bajos niveles de colas enrolladas que confirman la baja motilidad y viabilidad de los espermatozoides antes de la capacitación. En este último caso, se pudieron encontrar espermatozoides que no presentaban colas enrolladas, como el señalado en la Figura 13.

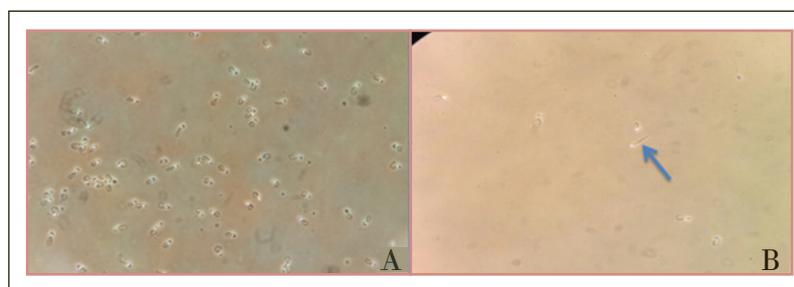


Figura 13: Vista a 40X de resultados del HOS-test de una muestra capacitada (A) y de una muestra en fresco (B).

En el caso de las muestras sometidas a la tinción mediante eosina-y, se observa que tan sólo en aquellos espermatozoides cuya membrana plasmática se encuentra degradada el tinte penetra en la célula. Por lo tanto, visualmente podemos distinguir entre viables y no viables según hayan sido coloreados o no por la tinción, tal y como se muestra en la Figura 14.



Figura 14: Vista a 40X de resultados del test de la eosina de una muestra en fresco

Los valores medios para la motilidad progresiva, motilidad total, HOS-test y test de la eosina para las muestras frescas y capacitadas se presentan en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3: Valores medios de motilidad progresiva, motilidad total y HOS en la serie de muestras

HOS: % espermatozoides viables (con colas enrolladas) según el HOS-test.

SD: Desviación típica.

EOS: % espermatozoides viables (sin teñir) según el test de la eosina.

	Fresco	Capacitado	Total
Nº muestras	44	16	60
Motilidad progresiva (a+b) ± SD	52,31 ± 24,21	63,85 ± 31,15	54,48 ± 26,72
Motilidad total ± SD	56,08 ± 24,47	66,05 ± 29,96	58,74 ± 26,02
HOS ± SD	55,78 ± 23,74	65,45 ± 29,07	58,36 ± 25,24
EOS ± SD	48,85 ± 15,68	37,25 ± 14,74	45,75 ± 61,96

Con el objetivo de demostrar la relación entre la motilidad y los resultados tanto del HOS-test como del test de la eosina se realizaron dos análisis independientes para cada test de vitalidad.

En primer lugar, en relación al HOS-test, se llevó a cabo un análisis de regresión múltiple, teniendo en cuenta tanto la motilidad total como la motilidad lineal progresiva, respectivamente, así como el tipo de muestra (fresca o capacitada). La variable respuesta en los dos casos fue resultado obtenido en el HOS-test expresado como el índice de vitalidad por el HOS-test (HVI).

En este caso, tanto cuando consideramos la motilidad progresiva como cuando consideramos la motilidad total, se pudieron establecer relaciones entre el porcentaje de espermatozoides viables observado en el HOS-test. Estas relaciones ponen de manifiesto la posibilidad de predecir la viabilidad de la muestra a partir del cálculo de su motilidad. Además, en estos casos el tipo de muestra (fresca o capacitada) no influye en la relación.

No obstante, a la vista de las ecuaciones obtenidas a partir de los análisis de regresión múltiple, se puede afirmar que la estimación del porcentaje de viabilidad de la muestra de semen a partir de la motilidad total es el que se ajusta mejor ya que la ecuación obtenida en este caso tiene asociado un mayor R^2 ($R^2 = 97,10$) y una menor varianza residual (CMR = 0,0000136426).

Tabla 4: Diferentes ecuaciones para predecir el resultado del HOS a partir de la motilidad total y progresiva.

CMR: Cuadrado Medio Residual

Motilidad total (MT)	Motilidad lineal progresiva (MP)
$HOS=1.38+0.97 \cdot MT$	$HOS=7,74+0.93 \cdot MP$
R^2	R^2
97,10	96,82
CMR	CMR
$1,36 \cdot 10^{-5}$	27,86

Con el fin de afirmar que la diferencia observada entre las dos ecuaciones obtenidas no se debe al azar, se realizó un ratio entre las varianzas residuales de las dos ecuaciones. Se compararon las varianzas utilizando el test F con 60 grados de libertad ($F_{60, 60}$). La comparación resultó estadísticamente significativa ($p \text{ val} < 0,005$), por tanto, la diferencia entre las dos ecuaciones propuestas no es debida al azar y es posible afirmar que la viabilidad de una muestra de semen se puede predecir de manera más exacta a partir de la motilidad total de la muestra.

Del mismo modo que en el HOS-test, en aras de demostrar la relación entre la motilidad y los resultados del test de la eosina, se realizaron dos regresiones múltiples. Se tuvieron en cuenta tanto la motilidad total como la motilidad lineal progresiva en cada caso, así como el tipo de muestra (fresca o capacitada). En esta ocasión la variable respuesta en los dos casos fue el resultado obtenido en el test de la eosina expresado el índice de vitalidad del test de la eosina (EVI).

En los datos recogidos en la Tabla 5, se puede observar que en análisis de la motilidad total no se obtienen datos significativos, mostrando un valor muy elevado de muestras que no se explican por el modelo, pues el ajuste realizado tiene un valor de CMR más alto que en los casos anteriores. Del mismo modo, al analizar la motilidad progresiva se obtienen datos similares, mostrando que los valores recogidos empleando el HOS-test son mucho más relevantes estadísticamente.

Tabla 5: Diferentes ecuaciones para predecir el resultado del test de la eosina a partir de la motilidad total y progresiva

CMR: Cuadrado Medio Residual

Motilidad total (MT)	Motilidad lineal progresiva (MP)
$EOS=45,82+0,07 \cdot MT$	$EOS=46,29+0,07 \cdot MP$
R^2	R^2
1,15	1,11
CMR	CMR
398,69	398,86

Así pues, a la vista de las ecuaciones obtenidas a partir de los análisis de regresión múltiple, se puede afirmar que, bajo nuestra consideración, la estimación del porcentaje de viabilidad de la muestra de semen a partir del HOS-test se ajusta mejor al modelo esperado.

Del mismo modo, en vista de las Figura 15, queda reflejado que el HOS-test sigue una tendencia muy similar a la MT, ya que los valores de vitalidad obtenidos mediante ésta técnica son muy similares al recuento de MT llevado a cabo mediante el analizador automático de espermatozoides. Por el contrario, los valores de vitalidad obtenidos mediante el test de la Eosina siguen un patrón totalmente dispar en relación a los datos de MT obtenidos en las mismas muestras.

Este experimento fue diseñado como un estudio preliminar con el fin de comprobar si era posible establecer una relación entre la motilidad y viabilidad espermática, considerando dos de los tests usados clásicamente en las Unidades de Reproducción Asistida.

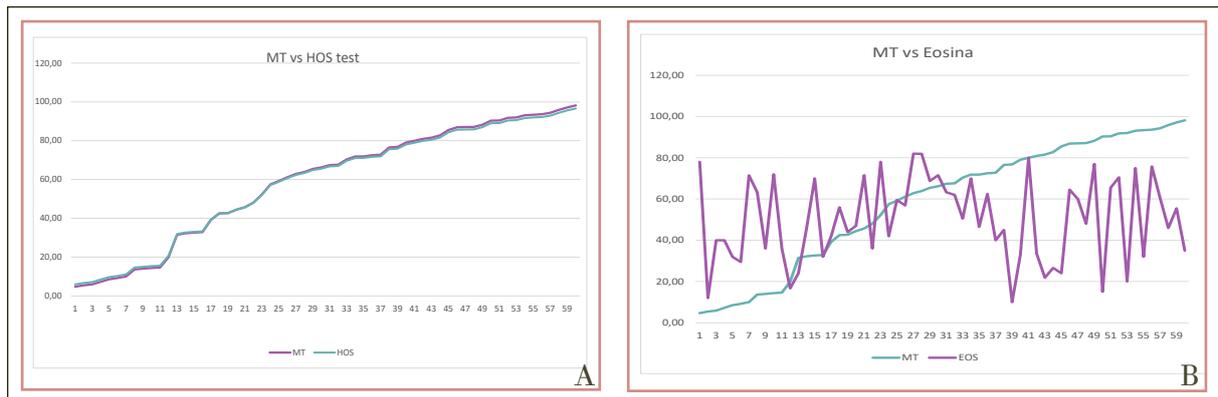


Figura 15: (A) datos de MT (%) en comparativa a la viabilidad estudiada mediante el HOS-test (%). Se observa la misma tendencia y por tanto, correlación. (B) datos de MT (%) en comparativa a la viabilidad estudiada mediante el test de la eosina (%). Se observa una tendencia totalmente dispar entre ambos parámetros y por tanto se confirma la imposibilidad de correlacionar ambas medidas.

Uno de los test de viabilidad que más comúnmente se emplea en el campo de la andrología es el HOS-test. Una de las mayores ventajas de realizar un HOS-test es la posibilidad de usar las muestras testadas en una ICSI posterior. Esto es especialmente relevante en enfermedades como el síndrome de Kartagener, caracterizado por una alteración en los cilios que impiden el movimiento del espermatozoide a pesar de ser viable (Peeraer *et al.*, 2004; Westlander *et al.*, 2003). Por otra parte, el test de la eosina no permite el uso posterior de la muestra testada ya que después de la tinción los espermatozoides quedan inhabilitados para su uso en TRA. Asimismo, atendiendo a los resultados obtenidos en nuestro ensayo y de acuerdo con los estudios de Ming-Huei *et al.* (Lin *et al.*, 1998) la falta de correlación entre motilidad y tinción por eosina podría deberse a que la alteración de la integridad de la membrana puede no estar asociada necesariamente con la pérdida de la motilidad de los espermatozoides. Sin embargo, en TRA y con mayor peso en aquellos casos que requieran ICSI, la integridad de membrana es un factor importante a considerar, teniendo una gran relevancia la motilidad a la hora de seleccionar aquellos espermatozoides a microinyectar.

La prueba de hinchamiento hipoosmótico (HOS-test) ha sido utilizada clínicamente en muestras frescas y criopreservadas como una herramienta útil en la identificación de espermatozoides inmóviles cuyas membranas estaban intactas. A pesar de que existen evidencias que destacan su uso como método para evaluar correctamente la integridad de la membrana de la cola espermática en muestras frescas de hombres fértiles y subfértiles, indicando el mantenimiento de la motilidad (Lin *et al.*, 1998). En la bibliografía consultada también existen estudios que ponen en duda la fiabilidad del HOS-test. En el trabajo de Martini y colaboradores (2016) se sugiere la presencia de falsos positivos en el este test de vitalidad.

Además, otros autores como Hossain y colaboradores (2010), ponen de manifiesto que existe un enrollamiento de colas espontáneo que se da en condiciones fisiológicas y que no es el resultado de la incubación de los espermatozoides en la solución hiposmótica. Este fenómeno puede enmascarar los resultados del HOS-test. Por tanto, es interesante disponer de una técnica para estudiar de manera objetiva, rápida, sencilla y económica la viabilidad de la muestra de semen.

En este sentido, la motilidad total es un parámetro que, como se ha demostrado en este trabajo, está relacionado con la viabilidad espermática. Por otro lado, la motilidad progresiva no incluye todos los espermatozoides viables presentes en las muestras, mientras que la MT se ajusta en mayor medida a la medida de vitalidad (Palomar y Molina, 2017). Además, el análisis de la motilidad total de la muestra permite su uso posterior en una TRA ya que no tiene ningún impacto sobre la misma, ofreciéndonos un valor aproximado de la viabilidad total de la muestra, incluyendo todos los espermatozoides viables. Por lo tanto, a pesar de que el test de la eosina sería una herramienta útil para complementar la información aportada por el HOS-test, es una técnica menos objetiva, menos rápida y menos económica que evaluar la motilidad total de la muestra en un analizador automático de espermatozoides. Además, implica una mayor manipulación de la muestra y no permite el uso de la misma en una TRA posterior.

4.2 Experimento II: Evaluación de la toxicidad generada por distintos crioprotectores

En este caso, las muestras incluidas comprenden sólo muestras capacitadas en las que se ha seleccionado la fracción de espermatozoides con buena motilidad, puesto que se desea estudiar la influencia de los crioprotectores en la motilidad de la muestra. De este modo, se puede determinar más específicamente que las variaciones detectadas sobre la MT serán causadas por el efecto del CP y no por otros factores muestrales previos, pues en el proceso de capacitación se ha eliminado el plasma seminal. Dado que en el Experimento I del presente trabajo se ha comprobado que la MT es la variable que se adecua en mejor medida al estudio de la motilidad y viabilidad de la muestra, ésta será el parámetro en el que se base el estudio de la toxicidad de los distintos crioprotectores sobre las muestras capacitadas.

En este sentido, se obtuvieron un total de 25 muestras, las cuales fueron alicuotadas tal y como ha sido reflejado en el apartado de Materiales y Métodos. Cada una de las alícuotas fue tratada con cada uno de los diferentes medios y crioprotectores y su motilidad fue recogida en los tiempos estipulados (10 minutos, 1 hora, 2 horas y 24 horas).

A continuación, se estableció la media de la motilidad total observada en cada una de las alícuotas para cada tiempo, así como la desviación estándar obtenida en cada muestra respecto a la media. La Tabla 6 recoge estos parámetros estudiados.

Tabla 6: valores medios de MT (%) y sus desviaciones estándares (SD) obtenidos para cada CP a cada tiempo estudiado

	IVF	TYB 1:1	TYB 1:2	SCB 1:1	SCB 1:2
10 minutos (MT±SD)	83,96± 11,28	79,26± 11,74	78,05± 12,97	76,94± 19,77	77,87± 14,26
1 Hora (MT±SD)	56,57± 18,90	50,14± 12,13	78,05± 15,80	79,56± 12,56	77,03± 12,42
2 Horas (MT±SD)	75,1± 7,92	58,84± 15,13	61,67± 18,87	65,72±14,66	77,03± 13,97
24 Horas (MT±SD)	33,79± 24,47	39,90± 22,49	23,22± 16,33	38,88± 20,49	48,65±19,63

Con el fin de cuantificar el cambio en la motilidad total (MT) tras la incubación a diferentes tiempos con cada uno de los CP testados se calculó la diferencia del valor de MT a cada uno de los tiempos y la MT de la muestra inicial. Para establecer si las diferencias observadas fueron significativas se realizó un ANOVA considerando como factor los crioprotectores y el medio control incluidos en este estudio. En todos los análisis estadísticos realizados se ha considerado un nivel de significación estadística correspondiente a un p-valor < 0,05, a partir del cual se rechaza la hipótesis de partida y se acepta la hipótesis alternativa.

Así pues, para un tiempo de incubación de 10 minutos se obtuvieron los resultados expuestos en la Tabla 7. Como puede ser observado, se detallan los resultados obtenidos para estudiar la influencia de cada uno de los crioprotectores durante los diez primeros minutos de incubación. En total se estudiaron 105 muestras bajo estas condiciones. Cabe destacar que, en comparación con sus respectivas muestras iniciales, las sometidas a 10 minutos de incubación presentan valores de MT inferiores, es decir, que tanto los CP empleados como el IVF (control) provocan en la muestra una disminución de la motilidad. No obstante, la caída en la motilidad total a este tiempo es similar tanto en el medio de cultivo (control) como en las distintas concentraciones de los dos crioprotectores testados, ya que estas diferencias no son estadísticamente significativas (p-val=0,866).

Tabla 7: resultados del test ANOVA procedente de los datos de las muestras incubadas un período de 10 minutos. Se muestran las medias de las motilidades totales (MT) de cada muestra junto con sus desviaciones estándares (SD)

Crioprotector (CP)	MT \pm SD
IVF (medio de cultivo control) (1:1)	-47,95 \pm 7,84
TYB (1:1)	-40,01 \pm 7,84
TYB (1:2)	-40,66 \pm 7,84
SCB (1:1)	-36,53 \pm 7,84
SCB (1:2)	-38,00 \pm 7,84

De este modo, esta disminución puede estar provocada por el proceso natural que sufre la muestra al verse sometida a la incubación, sin mostrar diferencias significativas en el descenso de la MT entre las distintas muestras comparadas, es decir, el descenso tiene lugar de forma similar en todas ellas independientemente del compuesto al que han sido sometidas.

En segundo lugar, para las muestras que fueron incubadas durante una hora con los distintos CP se destacan los resultados mostrados en la Tabla 8. En este caso se testaron un total de 120 muestras en las cuales también se observa una disminución generalizada de la MT respecto a la muestra inicial. Se destaca que en este caso las diferencias sí que son significativas puesto que se observa un p-valor<0,05 (p-val=0,013).

Tabla 8: resultados del test ANOVA procedente de los datos de las muestras incubadas un período de 1 hora. Se muestran las medias de las motilidades totales (MT) de cada muestra junto con sus desviaciones estándares (SD)

Crioprotector (CP)	MT ± SD
IVF (medio de cultivo control) (1:1)	-34,83 ± 6,93
TYB (1:1)	-32,86± 6,93
TYB (1:2)	-37,21± 6,93
SCB (1:1)	-58,29 ± 6,93
SCB (1:2)	-57,37± 6,93

Asimismo, debemos remarcar que el efecto de TYB, tanto cuando se emplea el mismo volumen de muestra que de crioprotector (TYB 1:1), como cuando se emplea el doble de volumen de CP que de muestra (TYB 1:2), es menor sobre la MT. De este modo, se observa que el uso de SCB provoca una disminución drástica de la MT respecto a la muestra inicial, cercana al 55-60%.

No obstante, en la Tabla 9, se muestran los datos obtenidos de un total de 122 muestras que fueron incubadas durante 2h y cuyo análisis resultó significativo estadísticamente ya que el p-valor<0,05 (p-val=0,0247). Se observa que, pese a que la disminución de la MT continúa ejerciéndose de forma generalizada sobre todas las muestras, se revierte la situación que encontrábamos en las muestras incubadas 1h. De este modo, las muestras tratadas con el CP de yema de huevo (TYB 1:1), a ambas concentraciones (TYB 1:1 y TYB 1:2) presentan una disminución de la MT del 60%, mientras que las muestras incubadas con SCB, también a ambas concentraciones (SCB 1:1 y SCB 1:2), tan sólo presentan una disminución de aproximadamente el 40%. Por otro lado las muestras incubadas en medio de cultivo IVF también disminuyen drásticamente su MT, cercano al 55%. Todo ello indica que el CP de SCB mejora cuantitativamente la MT de la muestra, en comparación a TYB en incluso a las muestras control, por lo que no sólo impide el descenso natural de MT si no que mejora los resultados de motilidad total.

Tabla 9: resultados del test ANOVA procedente de los datos de las muestras incubadas un período de 2 horas. Se muestran las medias de las motilidades totales (MT) de cada muestra junto con sus desviaciones estándares (SD)

Crioprotector (CP)	MT ± SD
IVF (medio de cultivo control) (1:1)	-54.77 ± 6,24
TYB (1:1)	-60,87 ± 6,24
TYB (1:2)	-59,81 ± 6,24
SCB (1:1)	-43,85 ± 6,12
SCB (1:2)	-36,80 ± 6,12

Además del análisis cuantitativo, que ha reflejado que a tiempos de incubación superiores, parece que el crioprotector que contiene yema de huevo preserva peor la MT de las muestras, se ha llevado a cabo un análisis cualitativo del aspecto de las muestras incubadas con los distintos CP. En este sentido, pese que se ha considerado la yema de huevo como un componente esencial de los crioprotectores en las clínicas de reproducción asistida, presenta ciertas desventajas frente a otros CP comerciales. Entre ellos se destaca que puede provocar que la evaluación del semen resulte más difícil, que puede ser inconsistente en cuanto a su eficiencia y se cree que posee efectos perjudiciales en algunas circunstancias (Foulkes, 1977).

Las muestras tratadas con este CP adquieren una apariencia amarillenta opalescente, promovida por la presencia en su composición de tres lipoproteínas, entre otros componentes. Asimismo, en la Figura 16, se destaca la aparición de partículas posiblemente de naturaleza lipoproteica, que se generan en el intervalo de 1-2h de incubación y que como se ha mencionado previamente, dificultan los diagnósticos.

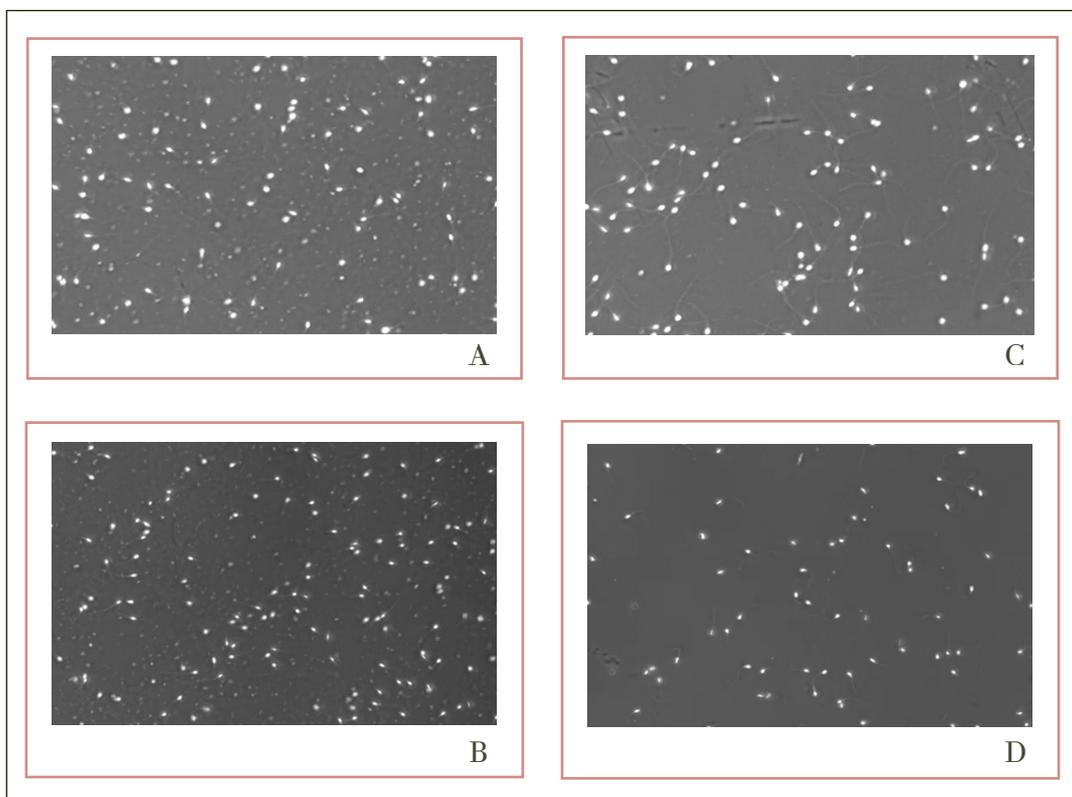


Figura 16: imágenes procedentes de dos alícuotas de la misma muestra, donde se puede apreciar en las figuras A y B el resultado obtenido tras la incubación durante 1h (A) y 2h (B) en TYB (A) y SCB (B), respectivamente.

Asimismo, acorde a los estudios de Foulkes (1977) se sugiere que una fracción del TYB que se une a los espermatozoides no se elimina fácilmente mediante lavado, por lo que a nivel práctico puede suscitar ciertas dudas en el uso de espermatozoides criopreservados empleando TYB en TRA tales como ICSI.

No obstante, este CP ejerce una función protectora durante el proceso de congelación que podría deberse a su efecto estabilizador de membranas, así como al mantenimiento de la presión coloidal del medio extracelular (Shannon y Curson, 1972).

En relación a su función protectora, ciertos estudios realizados en *Macaca Mulatta* (*Macacus Reshus*) sugieren que las LDL presentes en la yema de huevo pueden ofrecer protección a los espermatozoides. En esta hipótesis, se encontró una familia de proteínas ligadoras de lípidos presentes en plasma de toro seminal (proteínas BSP) que interactuaban con LDL. Estas proteínas BSP son secretadas por las vesículas seminales después de la eyaculación, y su unión a la membrana del espermatozoide induce el flujo de salida de colesterol y fosfolípidos, que a su vez produce una disminución de la resistencia al frío y la congelación. Cuando el semen se diluye con crioprotectores que contienen yema de huevo, el LDL secuestra la mayoría de las proteínas BSP presentes en el semen, evitando así la salida de lípidos de la membrana espermática y, en consecuencia, los espermatozoides son más resistentes al daño criogénico (Dong y Vandervoort, 2009).

Así pues, de acuerdo a la bibliografía consultada, el tratamiento con TYB también presenta ciertos efectos positivos en las muestras. En este sentido, se ha demostrado que su uso aumenta la capacidad de penetración espermática y reacción acrosomal; y se discute la posibilidad de que mejore las condiciones del semen en fresco. Se considera que aumenta los ratios de fertilización y concepción y que genera un menor daño cromosómico, una mejor tasa de recuperación post-descongelamiento así como mejoras en la unión a la zona pelúcida (ZP). (Jacobs *et al.*, 1995; Gamzu *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 2004).

De este modo, dado que se ha demostrado que tan sólo los espermatozoides que hayan sufrido la reacción acrosomal serán capaces de fusionarse con la membrana oocitaria, el tratamiento con TYB incrementará los niveles de penetración, favoreciendo que las células sean más fusogénicas. Pese a ello se destaca que no se trata del tratamiento con TYB per se, si no de su complementación con la temperatura (Jacobs *et al.*, 1995).

Por ello, en vista a nuestros resultados, se podría discutir que el menor descenso de la MT en las muestras incubadas 1h con TYB podría estar promovido por un aumento de las reacciones acrosomales, observando la decaída de la motilidad en tiempos mayores de incubación con este CP. Asimismo, de acuerdo con Gamzu y colaboradores (1997), ésta mejoría en la capacidad de unión del espermatozoide al oocito sólo se refleja en una parte de las muestras; siendo la fuente de esta selectividad desconocida (Gamzu *et al.*, 1997). Esto también explicaría la disparidad de resultados dentro de las muestras incubadas con TYB, donde en algunos casos se observa una disminución drástica de la MT y concentración espermática, mientras que en otros se mantiene, resultando en valores medios favorables.

Por último, se analizaron un total de 104 muestras sometidas a 24h de incubación. En la Tabla 10 se puede observar que dado que el p valor > 0,05 (p-val=0,2621) los resultados no se consideran significativos. No obstante, se observa una mayor conservación de la MT con el uso del CP de SCB a doble volumen (SCB 1:2), por lo que se recomendaría ampliar el tamaño muestral para confirmar que estas diferencias no son aleatorias si no que demuestran la menor toxicidad con los distintos CP.

Tabla 10: resultados del test ANOVA procedente de los datos de las muestras incubadas un período de 24 horas. Se muestran las medias de las motilidades totales (MT) de cada muestra junto con sus desviaciones estándares (SD)

Crioprotector (CP)	MT ± SD
IVF (medio de cultivo control) (1:1)	-44,67 ± 6,68
TYB (1:1)	-48,88 ± 6,24
TYB (1:2)	-52,35 ± 8,88
SCB (1:1)	-42,36 ± 6,54
SCB (1:2)	-30,37 ± 6,83

Además, tras el análisis cualitativo de las muestras se puede observar el mismo comportamiento observado previamente. Las muestras que han sido incubadas en TYB presentan un grado alto de partículas en suspensión, así como una menor concentración espermática y MT que las muestras sometidas a otros CP. Como se puede observar en las Figura 17, y tal y como se preveía en la Figura 14 en las muestras incubadas 1 y 2h, en las muestras de TYB incubadas 24h resulta difícil discernir entre los componentes procedentes del CP y los espermatozoides. Este proceso de precipitación de partículas por tanto comienza a aparecer en períodos de incubación de 1-2h pero a las 24h se puede comprobar que ha aumentado considerablemente.

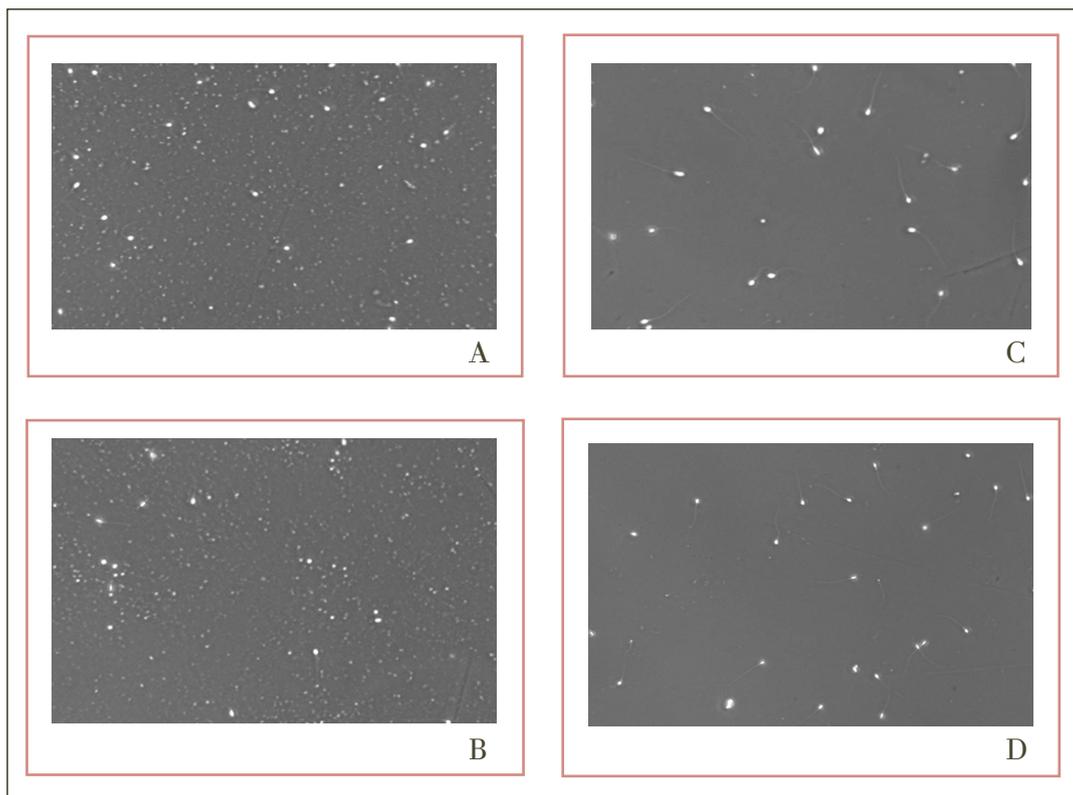


Figura 17: comparativa entre las distintas alícuotas de una misma muestra sometida a 24h de incubación con los distintos CP testados, donde: (A) Control-IVF, (B) TYB 1:1, (C) TYB 1:2, (D) SCB 1:1, (E) SCB 1:2

Es importante destacar que, en los procedimientos de congelación de espermatozoides humanos, en los que se requiere el uso de agentes crioprotectores, la toxicidad de estos compuestos afectará en la medida del tiempo de exposición del CP con los espermatozoides antes de la congelación. En los protocolos estandarizados el tiempo de exposición al CP antes de someter a la muestra al proceso de descenso de temperatura oscila entre 10 a 15 minutos.

Por esta razón se ha incluido en el ensayo de toxicidad la medida de las muestras tras 10 minutos. Tal y como demuestran los resultados del presente trabajo, se recomienda que entre la adición del CP y el inicio de la congelación no transcurra más de una hora, ya que a tiempos cortos (10 minutos) no se observan diferencias entre el medio control y los medios crioprotectores, en términos de motilidad espermática. Sin embargo, las diferencias en cuanto a toxicidad empiezan a observarse a partir de la primera hora de incubación. Esta conclusión coincide con la expuesta por Tiwari y colaboradores (2017), quienes estipularon que la motilidad disminuye a medida que aumenta el periodo de incubación con los distintos CP.

Asimismo, la falta de significación estadística a las 24 horas de cultivo con el CP no se debería a la toxicidad del CP en sí mismo sino a la pérdida de la motilidad tanto de la muestra control como de la muestra problema. Del mismo modo, tal y como se puede comprobar en la Figura 18, puesto que se ha observado cualitativa y cuantitativamente ésta disminución de la MT en las muestras incubadas, se deberá prestar especial atención al tiempo al que se somete a las muestras espermáticas en su protocolo de congelación, teniendo especial cuidado en aquellas muestras que se traten con TYB.

Por todo ello y tal y como se ha comentado previamente, en vista a la Figura 18 se remarca la indiscutible disminución de MT observada a medida que aumenta el tiempo de exposición a todos los CP, incluidas las muestras control (IVF). Se observa cómo esta disminución de la MT tiene lugar en todas las muestras pero pudiendo distinguir un descenso menor en las muestras tratadas con SCB (a ambas concentraciones, 1:1 y 1:2). No obstante, los resultados obtenidos en las muestras incubadas 1h, denotan un mejor funcionamiento de TYB para dicho tiempo, que podría ser explicado por la activación de la reacción acrosomal comentada previamente, que provocaría una hiperactivación espermática y por tanto, mantenimiento de la MT. En contraste, las muestras sometidas a 2h de incubación presentan una mejor MT cuando han sido incubadas con SCB, y tal y como se observa en la Tabla 9, siendo sus resultados incluso mejores que los presentados en la línea control (IVF) en determinados tiempos.

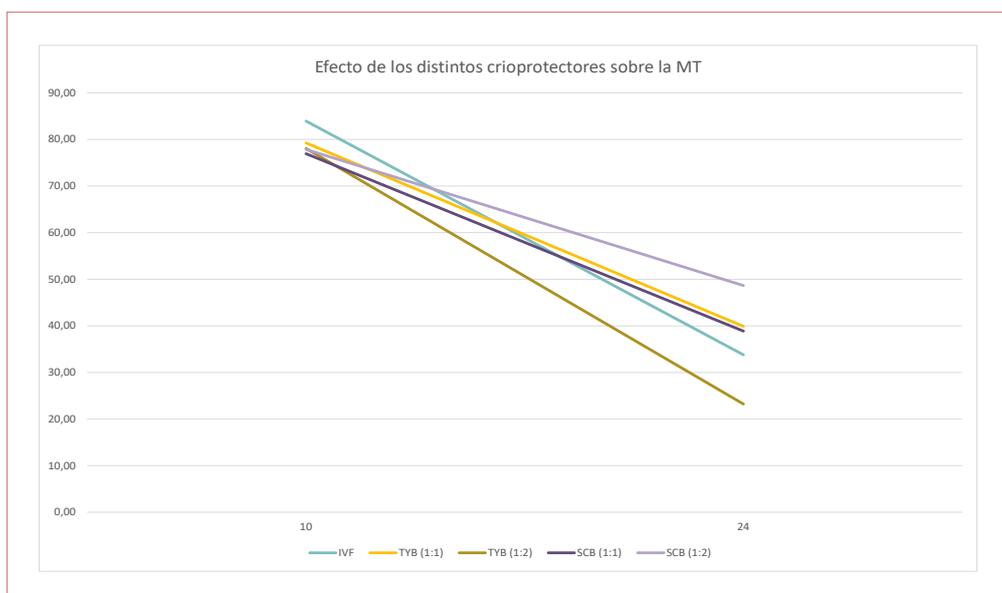


Figura 18: Descenso de la MT (%) en las muestras sometidas a incubación en el tiempo (10 minutos y 24h) con distintos CP (IVF, TYB 1:1, TYB 1:2, SCB 1:1, SCB 1:2)

En conclusión, a la vista de los resultados podemos concluir que el tiempo de exposición al CP que más se aproxima a los procedimientos de congelación de espermatozoides humanos en los laboratorios de FIV es el correspondiente a 1 hora y que además es el que presenta unas mayores diferencias significativas ($p= 0.013$). Por otra parte, se debe incidir en que, a los 10 minutos de incubación, no se observa toxicidad para ninguno de los CP estudiados.

A parte de los resultados que se desprenden, es importante destacar la robustez metodológica del presente trabajo. La mayoría de estudios similares publicados no tienen en cuenta el uso de alícuotas de una misma muestra a la hora de testear los diferentes medios y crioprotectores. En este sentido se destaca, entre otros, los trabajos de Tiwari y colaboradores (2017), así como Nallella Kiran y colaboradores (2004) donde se realizan estudios comparativos entre alícuotas que no provienen de la misma muestra y/o paciente. Además el número de muestras estudiadas es muy escaso. Todas estas carencias metodológicas se han tenido en cuenta en el presente trabajo, lo que ha permitido establecer conclusiones sólidas.

Por otra parte, el protocolo seguido en los ensayos de toxicidad espermática ha permitido establecer diferencias, en términos de MT, en los niveles de toxicidad. Por tanto, estos resultados no sólo son útiles en el ámbito de la criopreservación sino que el diseño del ensayo se podrá extrapolar a otros ámbitos, tales como el desarrollo de medios de cultivo, métodos y medios de almacenamiento, y otros productos usados en el campo de la reproducción asistida como por ejemplo geles o lubricantes. Así pues, a partir de la toxicidad espermática sería posible realizar estudios similares con el fin de seleccionar los productos de uso más común en la práctica clínica diaria que ofrezcan más garantías de seguridad.

Por último, puesto que no se ha trabajado a temperaturas criogénicas, en futuros ensayos podría contemplarse que los resultados varíen con efecto de la disminución de la temperatura, dado que el efecto de los CP podrá diferir en base a este factor. Por tanto, podría destacarse como una línea futura de trabajo el estudio y comparativa de los resultados obtenidos en este trabajo con los efectos de los CP a temperaturas de congelación.

Por todo ello, se concluye que en el ámbito de investigación de reproducción asistida, no resulta sólo importante promover el estudio de los efectos del descenso de la temperatura si no la toxicidad de los CP en si misma sobre la muestra, para poder así optimizar los protocolos de criopreservación empleados en TRA.

Conclusiones

5. Conclusiones

Las conclusiones derivadas del presente trabajo han permitido obtener respuesta a los objetivos planteados inicialmente. Así pues, de acuerdo con los resultados y su discusión se puede concluir que:

1. La MT evaluada de forma automática mediante el analizador de espermatozoides es una variable sólida debido a su efectividad y objetividad. Permite predecir la viabilidad espermática ya que está íntimamente correlacionada con los resultados del HOS-test. Sin embargo, el test de la eosina no muestra correlación alguna ni con los resultados del HOS-test ni con la MT. Por lo tanto, en base a nuestra experiencia es preferible emplear otros métodos de análisis de viabilidad tales como el HOS-test o la MT.

2. El uso de la MT en los ensayos de supervivencia espermática ha permitido establecer diferencias significativas en términos de viabilidad entre los diferentes medios y crioprotectores testados. En vista de los resultados obtenidos, a tiempos cortos, no se observan diferencias en la toxicidad de los distintos compuestos (CP y medio de cultivo). Por tanto se recomienda prestar especial atención al tiempo que transcurre entre la adición del CP a la muestra y su congelación, que no debe superar los 10-15 minutos. Por otro lado, a partir de tiempos de incubación superiores a 1 hora sí que existen diferencias en términos de MT tanto entre los CP como con el medio de cultivo. En función del CP utilizado se han podido observar dos tendencias distintas, ya que mientras que el CP sin excipientes de origen animal (SCB) muestra una mayor caída inicial de la MT respecto al CP de yema de huevo (TYB), tras dos horas de incubación parece preservar mejor la MT que este último.

Finalmente en futuros trabajos sería interesante profundizar más en el estudio del efecto tóxico de los distintos CP incluyendo otras condiciones experimentales tales como la adaptación de las temperaturas a las empleadas en los protocolos de congelación (a temperaturas bajas por encima del punto de congelación). Asimismo, este ensayo y sus conclusiones no son sólo útiles en el campo de la criopreservación si no que puede ser extendido a otros ámbitos dentro de la Reproducción Asistida.

Bibliografía

Bibliografia

- AGARWAL A.; MULGUND A.; HAMADA A. & CHYATTE M.R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 13:37
- AMMAN R. & WABERSKY D. (2013) Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* , 81: 5-17
- AUGER J.; SERMONDADE N. & EUSTACHE F.(2016) Semen quality of 4480 young cancer and systemic disease patients: baseline data and clinical considerations. *Basic and Clinical Andrology*: 26: 3
- BOIVIN J.; BUNTING L.; COLLINS J.A. & NYGREN K.G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction* 22: 1506–1512
- BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; SOSTARIC E.; FEITSMA H. & GADELLA B.N. (2011) Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology* , 76:1473-1486
- BURGOS M.H. & DI PAOLA G. (1951) Eosin Test for the Evaluation of Sperm Vitality. *Fertility and Sterility*, 2:542-544
- CALHAZ-JORGE C.; DE GEYTER C.; KUPKA M. S.; DE MOUZON J.; ERB K.; MOCANU E.; MOTRENKO T.; SCARAVELLI C.; WYNS C.; GOOSSENS V. (2017). Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE, *Human Reproduction*. 10: 1957-1973.
- COOK MEDICAL: Sydney IVF Sperm Cryopreservation Buffer https://www.cookmedical.com/products/wh_sisc_webds/
- DONG Q. & VANDEVOORT C.A. (2009) Effect of Egg Yolk on Cryopreservation of Rhesus Monkey Ejaculated and Epididymal Sperm. *Journal of Andrology*, 30: 309-316
- FERRARETTI A.P.; NYGREN K.; NYBOE ANDERSEN A.; DE MOUZON J.; KUPKA M.; CALHAZ-JORGE C; WYNS C.; GIANAROLI L. & GOOSSENS V.(2017) Trends over 15 years in ART in Europe: an analysis of 6 million cycles. *Human Reproduction Open*, 2017: 1–10
- FOULKES J.A. (1977) The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod.Fert.* 49: 277-284
- GAMZU R.; YOGEV L.; BOTCHAN A.; AMIT A.; LESSING J. B.; LICHTENBERG D.; PAZ G. & YAVETZ H. (1997). Effect of sperm preparation with TEST yolk buffer on sperm-binding capacity under hemizona assay conditions. *Andrologia* 29: 17–21.
- HOFFMANN, N.; OLDENHOF H.; MORANDINI C.; ROHN K. & SIEME H. (2011). Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Anim. Reprod. Sci.* 125, 112–118.
- HONDA, S.; WEIGEL A.; HJELMELAND L.M. & HANDA J. T. (2001). Induction of Telomere Shortening and Replicative Senescence by Cryopreservation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 493–498

HOSSAIN A.; OSUAMKPE C.; HOSSAIN S. & PHELPS J.Y. (2010) Spontaneously developed tail swellings (SDTS) influence the accuracy of the hypo-osmotic swelling test (HOS-test) in determining membrane integrity and viability of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* 2,3:83-86

IRVINE SCIENTIFIC (,Catalog ID: 90128) <http://www.irvinesci.com/products/90128-freezing-medium-tyb-with-glycerol-gentamicin?dpt=Assisted+Reproductive+Technology>

JACOBS B.R.; CAULFIELD J. & BOLDT J. (1995) Analysis of TEST (TES and Tris) yolk buffer effects on human sperm. *Fertility and Sterility.* 63:1064-1070

JAMEEL T. (2008) Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination *J Pak Med Assoc.* 58(2):71-74

JENSEN J.R.; WALKER J.H.; MILKI A.A.; WESTPHAL L. & BEHR B. (2004) The Effect of a Two-Hour, Room Temperature Incubation of Human Spermatozoa in TEST-Yolk Buffer on the Rate of Fertilization in Vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 5:169-173.

JEYENDRAN R.S.; VAN DER VEN H.H.; PEREZ-PELAEZ M.; GRABO B.G. & ZANEVELD L.J.D. (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal Reproduction Fertility;* 70:219-225.

KHATUN A.; RAHMAN S.; Pang M.G. (2018) Clinical assessment of the male fertility. *Obstet Gynecol Sci* 61(2):179-191

LECHNIAK D.; KEDZIERSKI A. & STANISLAWSKI D. (2002). The use of HOS-test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro. *Reprod Dom Anim* 37: 379-380

LIN M.H.; MORSHEDI M.; SRISOMBUT C.; NASSAR A. & OEHNINGER S. (1998) Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-Y staining. *Fertility Sterility,* 6:1148-1155.

MARTINI A. C. MOLINA R.I.; ESTOFÁN D.; TISSERA A., RUIZ R.D. & DE CUNEO M.F. (2016) Improving the predictive value of the hypoosmotic swelling test in humans. *Fertil. Steril.* 85: 1840-1842

MASCARENHAS M.N.; FLAXMAN S.R.; BOERMA T.; VANDERPOEL S. & STEVENS GA. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 *Health Surveys.* PLOS Medicine 12.

MELLISO E. (2010) Manual de Laboratorio de Reproducción Animal, Práctica 4. Universidad Nacional Agraria La Molina.

NALLELLA K.P.; SHARMA R.K.; ALLAMANENI S.S.R; AZIZ N. & AGARWAL A. (2004) Cryopreservation of human spermatozoa: Comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertility and Sterility,* 82: 913 – 918

O'CONNELL M.; MCCLURE N. & LEWIS S.E.M. (2002) The effects of cryopreservation on

sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod.* 17, 704–709

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Infertility is a global public health issue. (2018) Sexual and reproductive health. Visto el 30 de marzo de 2018 <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/perspective/en/#>

OVODONANTE (2016). ¿Qué es el seminograma y cuándo se considera normal? Visitado el 12 de Junio de 2018
<https://ovodonante.com/que-es-el-seminograma-y-cuando-se-considera-normal/>

OVODONANTE, (2017a) ¿Qué es la astenozoospermia?-Definición, causas y tratamiento. Visitado el 12 de junio de 2018
<https://www.reproduccionasistida.org/astenozoospermia/>

OVODONANTE, (2017b) ¿Qué valores son normales en el análisis de movilidad espermática? Visitado el 12 de junio de 2018
<https://www.reproduccionasistida.org/analisis-de-la-movilidad-de-los-espermatozoides/>

OVODONANTE, (2017c) Espermatozoides con necrospermia: definición, causas y tratamiento. Visitado el 12 de junio de 2018
<https://www.reproduccionasistida.org/necrospermia/>

PALOMAR RIOS A. & MOLINA BOTELLA I. (2017). Sperm parameters that play a major role in the assessment of semen quality after cryopreservation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 10:1271-1276

PEERAER K.; NIJS M.; RAICK D. & OMBELET W. (2004) Pregnancy after ICSI with ejaculated immotile spermatozoa from a patient with immotile cilia syndrome: a case report and review of the literature. *Reproductive BioMedicine Online* 9: 659-663

SHANNON P. & CURSON B. (1972) Toxic Effect and Action of Dead Sperm on Diluted Bovine. *Semen Journal of Dairy Science* , 55: 614 – 620

SHARLIP I.D.; JAROW J.P.; BELKER A.M.; LIPSHULTZ L.I.; SIGMAN M.; THOMAS A.J.; SCHLEGEL P.N.; HOWARDS S.S.; NEHRA A.; DAMEWOOD M.D.; OVERSTREET J.W.; & SADOVSKY R. (2002) Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril.*, 77:873–882.

SIEME H.; OLDENHOF H. & WOLKERS W.F. (2016) Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science* .169:2–5.

SIKKA S.C & HELLSTROM W.JC. (2016) Current updates on laboratory techniques for the diagnosis of male reproductive failure. *Asian Journal of Andrology*: 18, 392–401

THONNEAU P.; MARCHAND S.; TALLEC A.; FERIAL M.L.; DUCOT B.; LANSAC J.; LOPES P.; TABASTE J.M. & SPIRA A. (1991). Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988–1989). *Human Reproduction*, 6:811–816.

TIWARI A.; TEKCAN M.; SATI L.; MURK W.; STRONK J. & HUSZAR G. (2017) A new media without animal component for sperm cryopreservation: motility and various attributes affecting paternal contribution of sperm. *J Assist Reprod Genet.* ; 34:647–657

WALLACE W.H.; ANDERSON R.A. & IRVINE D.S. (2005) Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncology*; 4:209–218.

WESTLANDER G.; BARRY M.; PETRUCCO O. & NORMAN R. (2003). Different fertilization rates between immotile testicular spermatozoa and immotile ejaculated spermatozoa for ICSI in men Kartagener's syndrome: Case report. *Hum. Reprod.* 18:1286–1288

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010) WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th edition.

ZEGERS-HOCHSCHILD F.; ADAMSON G. D.; DE MOUZON J.; ISHIHARA O.; MANSOUR R.; NYGREN K.; SULLIVAN E.; VAN DER POEL S; ICMART & OMS. (2010). Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Salud Sexual y Reproductiva. *Red Latinoamericana de Reproducción Asistida*. 5pp.