

# **Evaluación del kit de congelación de semen en casa “«HOME SPERM FREEZING KIT”»**

Informe de Respuesta Ràpida

L'Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya (AQuAS) es una entidad de derecho público adscrita al Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya que actúa al Servicio de las políticas públicas. AQuAS tiene la misión de generar conocimiento relevante mediante la evaluación y el análisis de datos para la toma de decisiones, con el fin de contribuir a la mejora de la salud de la ciudadanía y la sostenibilidad del sistema de salud de Cataluña. AQuAS es miembro fundador de la International Network of Agencies of Health Technology Assessment (INAHTA) y de la International School on Research Impact Assessment (ISRIA), es miembro corporativo de la Health Technology Assessment International (HTAi), del CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), de la Red de Investigación en Servicios Sanitarios en Enfermedades Crónicas (REDISSEC) y de la Red de Investigación en Cronicidad, Atención Primaria y Promoción de la Salud (RICAPPS), y es Unidad Asociada a INGENIO (CSIC-UPV). En el año 2019, AQuAS fue reconocida con la medalla Josep Trueta al mérito sanitario por parte del Gobierno de la Generalitat de Catalunya.

Se recomienda que este documento sea citado de la manera siguiente: Estrada MD, Vivanco-Hidalgo RM, Pastells R. Evaluación del kit de congelación de semen en casa “«HOME SPERM FREEZING KIT” ». Barcelona: Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya. Departament de Salut. Generalitat de Catalunya; 2022.

Las personas interesadas en este documento pueden dirigirse a:

Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya.  
Roc Boronat, 81-95 (segona planta). 08005 Barcelona  
Tel.: 93 551 3888 | Fax: 93 551 7510 | <http://aquas.gencat.cat>  
© 2022, Generalitat de Catalunya. Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya

Edita: Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya  
Primera edició: Barcelona, octubre 2022  
Corrección y maquetación: Área de comunicación

Los contenidos de esta obra están sujetos a una licencia de Reconocimiento-NoComercialSinObraDerivada 4.0 Internacional.



La licencia se puede consultar en:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>

# Avaluació del kit de congelació de semen a casa “«HOME SPERM FREEZING KIT”»

## Autoría

**Maria-Dolors Estrada** Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya (AQuAS). CIBER en Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP, Spain.

**Rosa M Vivanco-Hidalgo.** Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya (AQuAS).

**Roland Pastells. Documentalista.** Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya (AQuAS).

# Índice

Introducción .....	6
Uso de espermatozoides de donante en medicina reproductiva .....	6
Preservación de la fertilidad .....	7
Tratamiento de la infertilidad .....	7
Breve descripción de la técnica evaluada .....	8
Objetivo .....	10
Metodología .....	11
Resultados .....	12
Objetivo 1 .....	12
Objetivo 2 .....	12
Conclusiones .....	15
Recomendaciones para ayudar en la toma de decisiones .....	16
Anexo 1. Examen y procesamiento del semen humano según el manual de laboratorio de la OMS, 6ª edición, 2021 (6) .....	17
1. Procedimientos previos al examen de semen .....	17
1.1. Información del paciente .....	17
1.2. Recogida de muestras .....	18
1.3. Manipulación inicial de muestras .....	19
2. Evaluación del riesgo de criopreservación y almacenaje de semen humano .....	19
2.1. Recursos .....	19
2.2. Seguridad y protección del personal .....	20
2.3. Riesgo de contaminación cruzada .....	20
2.4. Seguridad de las muestras congeladas .....	21
3. Protocolos de criopreservación de semen .....	21
3.1. Procedimiento estándar .....	22
3.2. Etiquetado de pajuelas/crioviales y registros .....	25
3.3. Vitrificación .....	25
Protocolo de vitrificación directa .....	26
Anexo 2: Estrategia de búsqueda y registros identificados según fuente consultada .....	28
Búsqueda definitiva en diferentes bases de datos bibliográficas (N=28) .....	28
Bibliografía .....	32

# Introducción

La criopreservación (congelación) de espermatozoides es actualmente una parte importante del trabajo de muchos laboratorios de análisis de semen, especialmente los asociados a clínicas de infertilidad, que disponen de criobancos de semen.

La razón que justifica la creación de un criobanco de semen humano es el uso futuro de los espermatozoides. Este uso futuro se podrá hacer a través de técnicas de reproducción humana asistida (RHA) autólogas y como parte de banco de donantes, las técnicas de RHA homólogas.

La historia de la criobiología del espermatozoides humano data de finales de la década de 1940. El descubrimiento de que el glicerol protegía los espermatozoides contra los daños de la congelación provocó el almacenamiento de espermatozoides humanos en hielo seco a  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se empezó a usar nitrógeno líquido. La criopreservación del semen se desarrolló en muchos países con el establecimiento de bancos de espermatozoides.

Actualmente se utilizan varios protocolos de criopreservación con diferentes crioprotectores y procedimientos de congelación. La supervivencia celular tras la congelación y la descongelación depende, en gran medida, de la minimización de la formación intracelular de cristales de hielo. Esto se hace mediante el uso adecuado de crioprotectores y aplicando velocidades de enfriamiento y calentamiento que minimicen la cantidad de agua intracelular sujeta a formación de hielo. Si los espermatozoides pasan periodos de tiempo significativos por encima de  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  (temperatura de transición vítrea), especialmente durante el proceso de descongelación, se puede producir la recristalización, con el crecimiento de cristales de hielo intracelulares potencialmente dañinos. Existen dos categorías de crioprotectores: permeables, como el dimetilsulfóxido y el glicerol; e impermeables, como las albúminas, los dextranos y el citrato de yema de huevo.

Los espermatozoides humanos toleran una serie de velocidades de enfriamiento y calentamiento. Los espermatozoides no son muy sensibles a los daños causados por un enfriamiento rápido inicial (choque frío), probablemente por la alta fluidez de la membrana de los ácidos grasos insaturados de la bicapa lipídica. También pueden ser más resistentes que otras células a los daños de la criopreservación a causa de su bajo contenido en agua (cerca del 50%). Aun así, la criopreservación tiene un efecto adverso sobre la función del espermatozoides humano, sobre todo sobre la motilidad. Después de la criopreservación, el porcentaje de espermatozoides móviles puede disminuir de un 50,6% al 30,3%, según algunos estudios (1). La optimización del proceso de criopreservación probablemente minimiza este daño.

Algunas razones para la criopreservación de espermatozoides son:

## Uso de espermatozoides de donante en medicina reproductiva

El semen de donantes sanos conocidos o presuntamente fértiles puede almacenarse para un uso futuro. En muchos países se tiene que poner en cuarentena el semen de donante durante seis meses para realizar análisis de infecciones de transmisión sexual y comprobar que no contengan microorganismos, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Los donantes pueden ser reclutados por una clínica o un banco de esperma y sus espermatozoides utilizados de manera anónima, o no, según la legislación y directrices nacionales.

Los espermatozoides del donante se pueden usar para inseminación artificial, inseminación intrauterina (IUI), fecundación in vitro (FIV) o microinyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) en determinadas situaciones, por ejemplo:

- Para la pareja de un hombre fértil sin espermatozoides vivos ni espermátides alargadas adecuadas para ICSI, o donde el tratamiento ha fallado o es demasiado caro;
- prevenir la transmisión de un trastorno hereditario;
- tras abortos recurrentes, donde se puede inseminar con espermatozoides de donante y conseguir embarazo;
- para mujeres que quieren concebir, pero no tienen pareja masculina, en los países donde está permitido.

## Preservación de la fertilidad

El semen se puede obtener y almacenar antes de que un hombre se someta a un procedimiento o exposición que pudiera afectar a su fertilidad como, por ejemplo:

- vasectomía (en caso de un cambio en el futuro en la situación de la pareja o el deseo de tener más hijos);
- tratamientos con agentes citotóxicos o radioterapia que puedan perjudicar permanentemente la espermatogénesis;
- servicio activo en una ocupación peligrosa, por ejemplo, en el ejército, en países donde la procreación póstuma es aceptable o cuando se puede producir una lesión genital;
- trauma testicular (en algunas circunstancias después de la extracción de esperma testicular, TESE).

## Tratamiento de la infertilidad

Los espermatozoides se pueden almacenar para su uso en tratamientos de infertilidad usando el esperma en IUI, FIV o ICSI, por ejemplo, en casos como:

- oligozoospermia severa o presencia intermitente de espermatozoides móviles en el semen (como apoyo para ICSI), o personas con síndrome de Klinefelter (durante la pubertad) cuando se puede recoger muestra de semen;
- tratamiento de la infertilidad que podría no persistir, como la cirugía para el tratamiento de obstrucciones del aparato genital o el tratamiento con gonadotrofina del hipogonadismo hipotalámico-hipofisario;

- la necesidad de recogida especial, como la eyaculación asistida para pacientes con lesión medular, espermatozoides por eyaculación retrógrada en la orina o recogida quirúrgica por el aparato genital;
- pacientes que no pueden proporcionar semen fresco el mismo día de la técnica de RHA como:
  - hombres que no pueden estar presentes en el laboratorio de técnicas de RHA el día de la inseminación o que tienen dificultades para recoger semen por motivos psicológicos;
  - hombres con azoospermia no obstructiva que requieren extracción de espermatozoides testicular;
  - hombres con lesión medular que requieren extracción de espermatozoides testicular;
  - hombres sometidos a vasovasostomía o vasoepididimostomía por azoospermia obstructiva con aspiración microquirúrgica del epidídimo o de espermatozoides testiculares
  - extracción para la preservación de la fertilidad.

La tasa de embarazo tras inseminación artificial con semen criopreservado de donante suelen estar relacionadas con la calidad del espermatozoide tras la descongelación, el momento de la inseminación y, en particular, los factores receptores como la edad, embarazo previo con inseminación y problemas ovulatorios y tubáricos uterinos (2). Si el semen se almacena en condiciones adecuadas no se observa deterioro evidente de la calidad del espermatozoide con el tiempo. Se han dado casos de niños nacidos tras la fecundación de semen almacenado durante más de 28 años (3, 4). En casos seleccionados (por ejemplo, cuando hay niveles elevados de leucocitos en el semen) se aconseja la selección de fracciones de espermatozoides muy móviles, ya que se puede producir una recuperación mejor, (5).

En el **Anexo 1** se han descrito los procedimientos relativos al semen humano según el manual de la OMS 2021, 6ª edición, que es una fuente esencial sobre las últimas informaciones basadas en la evidencia en este campo y un referente reconocido y utilizado ampliamente por laboratorios clínicos y de investigación de todo el mundo. (6). En particular, se han incluido los procedimientos previos al examen del semen, la evaluación del riesgo de criopreservación y almacenaje de semen humano y los protocolos de criopreservación de semen (convencional y rápida, o vitrificación).

## Breve descripción de la técnica evaluada

El Institut Marquès ha desarrollado y patentado un nuevo sistema que permite que los donantes de espermatozoides, los hombres implicados en técnicas de RHA o quienes quieran preservar su fertilidad puedan recoger la muestra de semen y criopreservarla inmediatamente después, introduciéndola en un tanque con nitrógeno líquido en el lugar donde se encuentren, siendo ellos quienes se encarguen de la criopreservación de su muestra de semen.

El hecho de que la recogida de la muestra de semen se pueda hacer en la privacidad de su casa y, en caso necesario, compartiendo esta parte del proceso de RHA con su pareja, es una de las ventajas que destacan sus desarrolladores, ya que permite minimizar el estrés que muchos hombres experimentan en esta etapa del proceso, así como la necesidad de viajar si se encuentran lejos de la clínica.

Los desarrolladores de este kit indican en el folleto informativo (7) que el hombre que esté interesado pueda tener una primera consulta con un médico mediante videoconferencia y, si está de acuerdo, utilizar el kit para recoger, criopreservar y enviar su muestra. Esto implica un ahorro significativo de tiempo ya que no es necesario viajar.

El envío se adapta a la agenda del paciente para que pueda escoger cuándo enviar la muestra.

La entrega del tanque y su recogida con la muestra de semen criopreservada se acuerda entre el hombre y la empresa de transporte de la clínica. Una vez recogida y criopreservada la muestra de semen, la empresa va a buscar el tanque dentro de las 48 horas posteriores y lo lleva a la clínica (o al banco de semen).

La información sobre el kit está formada por el folleto informativo facilitado por el peticionario (7), las instrucciones para la congelación de semen en casa (8) y un vídeo de Youtube identificado en Internet<sup>1</sup>.

La evidencia actual no describe ninguna diferencia importante entre el uso de espermatozoides crioconservados o espermatozoides frescos durante la RHA, aunque existen estudios que observan un aumento de la fragmentación del ADN después de la criopreservación (9).

Para apoyar la toma de decisiones por parte de la Direcció General d'Ordenació i Regulació Sanitària (DGORS) del Departament de Salut, se redacta el presente informe breve con el objetivo de revisar la evidencia científica al respecto.

---

<sup>1</sup> <https://www.youtube.com/watch?v=iFvinXbkILk>



# Objetivo

Sintetizar la evidencia del sistema de criopreservación de semen HOME SPERM FREEKING KIT desarrollado por el Institut Marquès en el marco de las técnicas de RHA.

Objetivos específicos:

1. Comparar la eficacia entre la recogida de semen y posterior criopreservación rápida (vitrificación) realizada en el domicilio por parte del donante o paciente/hombre interesado y la realizada en el laboratorio de RHA en cuanto a motilidad total, motilidad progresiva, morfología e índice de fragmentación del ADN de los espermatozoides, entre otras medidas de resultado relacionadas con la fertilidad (gestación y nacimiento).
2. Comparar el sistema «Home sperm freezing kit» con los estándares descritos en el manual de laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 6ª edición, 2021, sobre el examen y el procesamiento del semen humano descritos en el Anexo 1 (6).

# Metodología

Se ha redactado un informe de respuesta rápida basado en la revisión de la literatura científica.

En cuanto al objetivo 1 se llevó a cabo una búsqueda inicial exploratoria en Medline/PubMed para identificar ensayos clínicos aleatorizados (ECA) y revisiones sistemáticas o metaanálisis de ECA sobre la recogida de semen humano y criopreservación posterior (método rápido o vitrificación) en el domicilio en comparación con la realizada en el laboratorio del centro clínico de RHA o el banco de semen. Esta búsqueda, sin límites temporales ni de idioma, fue realizada el 21 de junio de 2022 por parte del documentalista de AQUAS tras analizar con las autoras del informe la estrategia más adecuada. A partir de los resultados de esta búsqueda inicial se diseñó la búsqueda definitiva que realizó el mismo documentalista el 20 de julio de 2022. Las bases de datos consultadas fueron: Medline (OVID), EMBASE, Cochrane, Scopus, WoS i Epistemonikos. En el **Anexo 2** se presenta la estrategia.

Para completar las búsquedas bibliográficas anteriores, las autoras realizaron una búsqueda de literatura gris en Internet durante el mes de junio de 2022 y una revisión manual de la bibliografía de los documentos incluidos en las búsquedas previas para identificar estudios pertinentes publicados, pero no identificados en las búsquedas.

Para conseguir el objetivo específico 2 se revisaron los materiales informativos facilitados por el peticionario sobre el «Home sperm freezing kit», sistema patentado por el Institut Marquès (8,9) y compararon su procedimiento con las especificaciones recogidas en el Manual de la OMS de reciente publicación, considerado el documento de referencia internacional en el campo del examen y procesamiento del semen humano (6) identificado en la búsqueda en Internet. En particular, la comparación se ha centrado en los procedimientos previos al examen de semen humano, la evaluación del riesgo de criopreservación y almacenaje de semen humano y los protocolos de criopreservación de semen humano (procedimiento estándar, etiquetaje y vitrificación). Además, se revisó el marco normativo de aplicación para la recogida de semen humano y procedimiento de criopreservación posterior vigente en España (Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica y la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida).

Por lo que respecta a Cataluña, se consultó la DGORS del Departament de Salut para conocer la situación legal.

La gestión bibliográfica se hizo con el programa EndNote.

Una de las autoras del informe se encargó de seleccionar los resultados de las búsquedas para incluir ensayos clínicos aleatorizados o revisiones sistemáticas con metaanálisis y que tuviesen como intervención a evaluar el sistema de criopreservación de semen «Home sperm freezing kit» en el marco de donantes de semen, técnicas de RHA o preservación de la fertilidad y como técnica de comparación la recogida de semen y criopreservación posterior realizada en el laboratorio clínico.

Dada la necesidad de respuesta rápida y con el objetivo de proporcionar la información sobre la evidencia publicada hasta la fecha, se ha hecho una lectura crítica a texto completo de los artículos incluidos, presentando los resultados de forma narrativa.

# Resultados

## Objetivo 1

De la búsqueda exploratoria en Medline/PubMed se identificaron 31 referencias. Como resultado de la revisión de título o resumen ninguna superó la fase de cribado según los criterios de inclusión descritos. De la búsqueda definitiva en Medline (OVID), EMBASE, Cochrane, Scopus, WoS i Epistemonikos del 20 de julio de 2022 se identificaron 28 registros que, después de eliminar duplicados, terminaron siendo 17. En el **Anexo 2** se informa de los registros identificados en cada una de las bases de datos bibliográficas consultadas.

Después de cribar por título o resumen, ninguno superó la fase de cribado. Es decir, no se identificó ningún ECA ni revisión sistemática con metaanálisis de ECA que comparase la recogida de la muestra de semen y criopreservación posterior en el domicilio y por parte del donante o paciente implicado en una técnica de RHA o de preservación de la fertilidad en comparación con la recogida de semen en el centro clínico y criopreservación posterior realizada por el personal de laboratorio o del centro clínico.

## Objetivo 2

Los procedimientos relacionados con la recogida de semen, ya sea de donantes, hombres que participan en técnicas de RHA o por preservación de la fertilidad y su posterior criopreservación se amparan en la Ley 14/2007 de investigación biomédica y la Ley14/2006 sobre técnicas de reproducción humana asistida. En ningún caso se indica que la recogida de semen se pueda hacer en casa, ni tampoco que la criopreservación de la muestra pueda ser realizada por el mismo individuo ni fuera del laboratorio clínico. En cuanto a Cataluña, la DGORS ha informado de que no se autoriza específicamente ni de forma expresa la recogida de semen en el domicilio del paciente, ni tampoco es autorizable que se puedan efectuar determinados procedimientos en la muestra obtenida.

Se han comparado las instrucciones de la congelación de semen en casa del sistema «Home sperm freezing kit» con los estándares de la OMS 2021 (6), destacando lo siguiente:

En cuanto a las instrucciones para obtener la muestra de semen: el «Home sperm freezing kit» cuenta con unas instrucciones escritas sobre la recogida de la muestra de semen y, por lo que indica el folleto informativo, se tiene acceso a una videoconferencia con un médico previa al envío del kit a domicilio, por lo tanto, también hay información oral. Las instrucciones del kit recomiendan que la muestra de semen se obtenga por masturbación después de un período de abstinencia eyaculatoria de entre tres y cinco días y que la eyaculación se recoja en su totalidad en un frasco estéril (uno de los componentes del kit). También se indica que es necesario lavarse las manos y los genitales con agua y jabón y aclarar con abundante agua. Entre los componentes del kit hay un formulario que debe rellenarse. No hay información sobre el contenido de este formulario. Estas instrucciones del kit se ajustan bastante a las establecidas en el Manual de la OMS, a pesar de que se considera que deberían explicitarse aspectos importantes, como por ejemplo que hay que evitar el uso de condones, el tiempo deseable entre la recogida de la muestra de semen y su criopreservación en

el domicilio y las temperaturas. Y, algo fundamental, la identificación de las muestras y el control de agentes infecciosos, aspectos bajo control cuando la recogida de la muestra de semen y su manipulación inicial se llevan a cabo en salas privadas del laboratorio y, posteriormente, por parte de un equipo técnico de laboratorio.

En cuanto a las instrucciones para la congelación de la muestra de semen y colocación de los criotubos en el tanque: la criopreservación y el posterior almacenaje de espermatozoides humanos son procesos altamente complejos que suponen una responsabilidad especial que recae en el personal técnico de laboratorio. En el caso del «Home sperm freezing kit», la criopreservación recae sobre el hombre tras haber obtenido la muestra de semen, sin ningún tipo de entrenamiento previo.

En cuanto a la evaluación de los riesgos asociados a la criopreservación y almacenaje de semen, en cuanto a recursos informa que entre los componentes del kit hay un contenedor con líquido crioprotector, un tanque de transporte de muestras biológicas con temperatura controlada con una varilla interior con una brida de seguridad en su embalaje. Aunque no se especifica, se supone que contiene nitrógeno líquido debido a que se dice que al abrir el tanque podría salir un poco de vapor (en el video se puede ver). En las instrucciones se avisa de que el crioprotector se debe guardar en la nevera cuando se recibe el kit y sacarlo antes de obtener la muestra de semen. No hay especificaciones sobre la idoneidad de los equipos para el uso propuesto (ni del tanque, ni de los criotubos ni de la varilla) ni se explicita la existencia de alarmas de niveles de nitrógeno líquido ni temperaturas ni precauciones relativas a reducir el riesgo de contaminación cruzada, a pesar de que el hecho de que el método de congelación sea el nitrógeno líquido y la muestra de semen con el crioprotector vayan en criotubos cerrados ya son precauciones que evitan el riesgo de contaminación cruzada. A pesar de ello, convendría explicitar qué acciones se llevan a cabo con el tanque para u descontaminación periódica ya que se entiende que el resto de componentes del kit son de un solo uso. En cuanto a la seguridad de las muestras congeladas, se indica que se tienen que identificar los cuatro criotubos.

En cuanto al protocolo para la criopreservación del semen, no hay información sobre el crioprotector usado en el kit y, por tanto, si es permeable o no permeable o si dispone de la certificación correspondiente, ya que es un producto preparado y se entiende que está disponible comercialmente. En cuanto al protocolo del kit, se reduce a las instrucciones incluidas. Y, como decíamos antes, en el video de presentación del producto, disponible en Internet, el procedimiento de criopreservación se hace en una mesa de comedor del domicilio del donante.

En las instrucciones del kit se indica cómo añadir el crioprotector a la muestra y se facilita una pipeta para mezclar bien la muestra de semen y el crioprotector. Las instrucciones también muestran cómo repartir la mezcla en los cuatro criotubos con la ayuda de otra pipeta y cómo desechar el material sobrante. También se indica el tiempo que se debe esperar (diez minutos) antes de abrir el tanque y cómo colocar los criotubos en la varilla, volverla a colocar en el interior del tanque de nitrógeno líquido, cerrarlo y empaquetarlo. El tanque con la muestra de semen en su interior debe ser recogido antes de que pasen 48 horas.

El sistema «Home sperm freezing kit» no informa sobre el procedimiento de descongelación del semen congelado.

Todos los criotubos van identificados con nombre, apellidos y fecha de obtención de la muestra; el tanque también. Se desconocen más detalles sobre este aspecto clave para la tipología de información revisada para redactar la presente valoración.

Por las características del kit y las instrucciones se considera que el método de criopreservación del semen del sistema «Home sperm freezing kit» es rápido, también llamado vitrificación, y de tipo aséptico, ya que utiliza sistemas cerrados (criotubos) sin contacto directo con el nitrógeno líquido. Los resultados de una revisión sistemática con metaanálisis de ensayos clínicos aleatorizados en el manual de la OMS 2021 (6) indican que la vitrificación del esperma es superior a la congelación convencional basándose en la comparación directa de la motilidad total y la motilidad progresiva. No obstante, la eficacia de la vitrificación se ve influida por el uso de diferentes protocolos de vitrificación y la criopreservación de espermatozoides de calidad distinta. Estas variables deberían ser consideradas al evaluar la calidad de los espermatozoides descongelados después de la vitrificación. Debido al reducido número de estudios con heterogeneidad clínica sustancial incluidos en este metaanálisis, se requieren estudios adicionales bien estructurados para confirmar la eficacia de la vitrificación en la criopreservación de espermatozoides, además de permitir el examen de los dos métodos de criopreservación en términos de consecución de embarazo y la determinación del impacto de las variables clínicas en la eficacia de la vitrificación (10).

## Conclusiones

No se ha encontrado evidencia en la literatura que compare la eficacia entre el sistema «Home sperm freezing kit» patentado por el Institut Marquès con el procedimiento habitual realizado en su totalidad en el laboratorio clínico.

La legislación vigente española y catalana no apoyan la recogida de muestras de semen fuera del laboratorio clínico ni que sea el interesado el encargado del procedimiento de criopreservación, ya sea mediante métodos convencionales o rápidos, como la vitrificación en tanques de nitrógeno líquido. Estos procedimientos de criopreservación deben hacerse en condiciones técnicas y en centros acreditados siguiendo escrupulosamente los requisitos considerados en el marco legal vigente.

Gran parte de los requisitos especificados en el manual de referencia internacional sobre el examen i procesamiento del semen humano vigente (OMS 2021) (6) no aparecen en el material publicitario del sistema «Home sperm freezing kit» que se ha revisad. Se considera que sería de interés completar estos vacíos de información.

La única revisión sistemática con metaanálisis identificada que compara la vitrificación con la congelación convencional de espermatozoides concluye que, a pesar de los mejores resultados intermedios en la motilidad con la vitrificación, se debe esperar a tener más estudios que confirmen la viabilidad de los espermatozoides descongelados después de una vitrificación con resultados finales (gestaciones y nacimientos).

# Recomendaciones para ayudar en la toma de decisiones

Se considera importante informar a los potenciales donantes, parejas sometidas a técnicas de RHA y a hombres interesados en la preservación de su fertilidad del riguroso proceso técnico que existe tras la criopreservación de una muestra de semen y el marco legal vigente, que indica que esta técnica debe realizarse en centros o laboratorios clínicos debidamente autorizados.

# Anexo 1. Examen y procesamiento del semen humano según el manual de laboratorio de la OMS, 6ª edición, 2021 (6)

## 1. Procedimientos previos al examen de semen

A diferencia de la mayoría de secreciones corporales examinadas para el diagnóstico o tratamiento, la eyaculación es una mezcla heterogénea de secreciones que no existe en el interior del cuerpo antes de ser expulsada. El esperma se produce a partir de una suspensión concentrada de espermatozoides almacenados en el epidídimo, mezclados y diluidos, principalmente, por el líquido prostático de la uretra y por el vaciado de la secreción de las vesículas seminales. Por lo tanto, las fracciones eyaculadas secuenciales no tienen la misma composición.

A continuación, se describen todos los pasos necesarios antes de que se pueda empezar los análisis reales del semen humano:

### 1.1. Información del paciente

El hombre debe recibir instrucciones claras, escritas y orales, sobre la recogida de la muestra de semen. El clínico debe dar la misma información al paciente.

- La recomendación principal es de eyaculación por masturbación:
  - El coitus interruptus no se recomienda y tan solo debería usarse en casos excepcionales debido al riesgo de recolección incompleta y de contaminación con el líquido y las células vaginales.
  - Los condones especiales para investigación de fertilidad podrían ser una alternativa en circunstancias excepcionales, pero no se dispondrá de toda la eyaculación para el examen y es posible que la muestra se contamine por contacto con la piel del pene y, en cierta manera, también por el líquido vaginal y las células del exterior del condón. Los preservativos anticonceptivos no pueden usarse debido a la presencia de agentes espermicidas. Los condones de látex convencionales no deben utilizarse para la recolección de semen porque contienen agentes que interfieren con la motilidad de los espermatozoides.
  - Hay que evitar el uso de lubricantes, ya que pueden contaminar la eyaculación y cambiar sus propiedades. En caso de ser absolutamente necesario su uso, se deben usar lubricantes no espermatotóxicos validados.
- La eyaculación debe recogerse completamente y el hombre debe informar de cualquier pérdida de fracción de la muestra.



- La eyaculación debe recogerse tras un mínimo de dos días y un máximo de siete días de abstinencia eyaculatoria.
- Para evitar la exposición del esperma a las fluctuaciones de temperatura y controlar el tiempo transcurrido entre la recogida y el análisis, se recomienda que la muestra se recoja en una sala privada del laboratorio. Idealmente, los análisis deberían empezar durante los primeros 30 minutos posteriores a la recolección, pero como mínimo dentro de los primeros 60 minutos.
  - Naturalmente, pueden ser necesarias excepciones individuales y cada persona tiene que recibir asesoramiento adecuado sobre las posibilidades y riesgos.
  - Si no recoge cerca del laboratorio, el transporte no puede permitir que la temperatura de la muestra sea inferior a 20 °C ni superior a 37 °C.
  - Si el paciente, por la razón que sea, tiene que recoger la eyaculación en otro lugar, el contenedor de muestras se debe mantener cerca del cuerpo, bajo la ropa (por ejemplo, bajo la axila) durante el transporte y debe entregarse en el laboratorio preferiblemente dentro de los 30 minutos posteriores a su recolección y no más tarde de 50 minutos después de recogerse.

## 1.2. Recogida de muestras

- Antes de recoger los espermatozoides, el recipiente de muestras debe mantenerse a temperatura ambiente, entre 20 y 37 °C, para evitar grandes cambios de temperatura que puedan afectar a los espermatozoides.
- El recipiente para muestras debe ser un recipiente limpio y de boca ancha, de plástico y de un lote confirmado como no tóxico para los espermatozoides.
- El contenedor de muestras, así como las hojas de trabajo correspondientes, deben etiquetarse con identificadores que, en combinación con los procedimientos de recepción y manipulación de las muestras, eliminen el riesgo de confusión entre muestras y hojas de trabajo. Los requisitos legales de los marcadores de identidad de contenedores pueden ser diferentes. Podría ser el nombre del hombre y el número de identificación, la fecha y la hora de la recolección, o los números de identificación de muestras únicas.
- Al recibir la muestra se deberá registrar la siguiente información, que se presentará en el informe final:
  - identidad del hombre (p. ej., nombre, fecha de nacimiento y número de código personal) y, idealmente, la confirmación de que la muestra es suya;
  - el período de abstinencia eyaculatoria previa;
  - fecha y hora de la recogida;
  - la integridad de la muestra y cualquier dificultad para conseguirla (por ejemplo, si la recogida no se llevó a cabo en el laboratorio) y

- el volumen de eyaculación.
- Se aplican condiciones especiales a situaciones específicas:
  - recogida estéril para RHA o criocirugía
  - recogida estéril para análisis microbiológicos.

### 1.3. Manipulación inicial de muestras

- Debe permitirse que el esperma recogido se licúe sin demora innecesaria, preferiblemente en una incubadora a 37 °C y, si es posible, en una plataforma de mezcla orbital para facilitar la licuefacción y la mezcla del espécimen.
- El tiempo entre la recolección y el inicio del examen de eyaculación debe registrarse al principio de la evaluación macroscópica y debe presentarse en el informe final. Preferiblemente, la evaluación debe empezar dentro de los 30 minutos posteriores a la recolección y no más tarde de 60 minutos después de la recolección. La exposición in vitro prolongada al líquido eyaculado licuado afectará a la calidad, la motilidad y la morfología.
- Las eyaculaciones pueden contener agentes infecciosos peligrosos (como virus de inmunodeficiencia humana [VIH], virus de la hepatitis o virus del herpes simple) y, por tanto, deben tratarse como riesgo biológico. Deben seguirse estrictamente las buenas prácticas de laboratorio para la seguridad de los laboratorios.

## 2. Evaluación del riesgo de criopreservación y almacenaje de semen humano

La criopreservación y posterior almacenaje de espermatozoides humanos es un proceso extremadamente complejo que supone una responsabilidad especial que recae en el personal del laboratorio.

En la evaluación de riesgos asociados a la criopreservación y almacenaje de semen se deben tener en cuenta las siguientes cuestiones:

### 2.1. Recursos

- Seguridad física de los recipientes, muestras y almacén, para reducir el riesgo de pérdida por robo o incendio, fallo de pajuelas (*straws*), botellas (*ampoules*) y recipientes (*vessels*) de crioconservación, y suministro de nitrógeno líquido.
- Idoneidad de equipos para el uso propuesto.
- Sistema de contención y eliminación de nitrógeno.

- Los depósitos (*tanks*) deben tener alarmas de nivel de nitrógeno por debajo de un cierto límite o de temperatura por encima de un cierto límite. El nivel de alarma debe configurarse de manera que proporcione un aviso antes de que se produzca una situación crítica y se debería conectar con un centro de llamadas que después asesorará al personal del banco de esperma en caso de incidencia.

## 2.2. Seguridad y protección del personal

- Los equipos de protección individual deben estar siempre disponibles en el banco. Si es posible, dos personas deberían estar presentes simultáneamente en el banco; en caso contrario se debe avisar al personal externo antes de entrar.
- Sistemas de alarma para la detección de niveles bajos de oxígeno atmosférico (se aconsejan acciones correctoras asociadas a estos).

## 2.3. Riesgo de contaminación cruzada

Para reducir el riesgo de contaminación cruzada con agentes infecciosos entre muestras en almacenaje (por ejemplo, transmisión del VIH o del virus de la hepatitis B [VHB] o C [VHC] a través de un recipiente de criopreservación), es necesario tener en cuenta:

- El tipo de contenedor de almacenaje: botellas o pajuelas y método de cierre de las pajuelas (color o polímero) y uso de una funda secundaria (*straw-in-straw*);
- naturaleza del recipiente de almacenaje: nitrógeno líquido o vapor;
- protocolo y método de almacenaje de muestras de alto riesgo (muestras que se sabe que contienen o se sospecha que contienen virus). En estos casos se recomienda el uso de tanques separados para cada positividad del virus y, en algunas zonas, es obligatorio;
- realizar la crioconservación de cada paciente por separado y desinfectar toda la superficie al final de cada procedimiento.

Otras precauciones a tomar para evitar o limitar la contaminación si no se pueden garantizar las precauciones anteriores:

- Esterilización de nitrógeno líquido para evitar la contaminación —útil en caso de vitrificación donde la muestra está sumergida directamente en nitrógeno líquido;
- Llenado periódico de matraces o depósitos de almacenaje con nitrógeno líquido estéril y descontaminación anual de los criotankes;
- Descontaminación de ejemplares congelados antes de su calentamiento;
- Realizar las pruebas de virus e infecciones de transmisión sexual a todos los hombres en el momento del almacenamiento en el banco de la siguiente manera (o según normativa nacional): VIH, tipos 1 y 2; VHB; VHC; *Treponema pallidum* (sífilis); *Chlamydia trachomatis*; *Neisseria gonorrhoeae*; virus linfotrófico de linfocitos T humanos y citomegalovirus (CMV).

Para los donantes de espermatozoides se pueden requerir otras pruebas según la legislación nacional.

#### 2.4. Seguridad de las muestras congeladas

- Dividir las muestras y almacenarlas en criorecipientes separados o en sitios diferentes para reducir el riesgo de pérdida total.
- Comprobar la identidad de las muestras en cada paso.
- Utilizar un buen etiquetaje y códigos de identificación.
- Disponer de procedimientos para la auditoría periódica del uso del material y las muestras almacenadas restantes.
- Tras un uso prolongado, los depósitos de criopreservación se pueden contaminar. Por tanto, deberían descontaminarse periódicamente con soluciones que no reaccionen con el aluminio o el acero. Se recomienda su descontaminación, como mínimo, una vez al año.
- Todos los depósitos deben contener alarmas de sensor de bajo nivel para controlar la temperatura y el nivel de nitrógeno líquido. Los sensores deben estar conectados a una alarma para alertar al personal del laboratorio de posibles problemas.
- El almacenamiento en fase de vapor en vez de en nitrógeno líquido puede reducir el riesgo de contaminación cruzada. No obstante, se pueden producir grandes gradientes de temperatura en recipientes de almacenamiento de vapor en función de su forma, la carga de muestras y el tipo de contenedores de las muestras. En caso de usar almacenamiento en fase de vapor debe asegurarse que los recipientes utilizados estén diseñados para ese propósito y ratificados según los estándares internacionales de dispositivos médicos.
- Las pajuelas seguras de resina ionomérica termosellable son adecuadas para el almacenamiento en nitrógeno líquido (pajuelas de alta seguridad). Son a prueba de fugas, bacterias y virus y mecánicamente resistentes a -196 °C.

### 3. Protocolos de criopreservación de semen

Hay diversos protocolos disponibles de congelación y gestión del banco de espermatozoides. También existen diversos crioprotectores disponibles comercialmente. Los crioprotectores, como se indicaba en la introducción, se clasifican en permeables (entre ellos el glicerol, el más utilizado) y no permeables (como las moléculas de azúcar y la yema de huevo).

A continuación, se detallan las características de un crioprotector de uso habitual (mezcla de glicerol, yema de huevo y citrato) el GEYC (del inglés *glicerol-egg yolk-citrate*) y los procedimientos de congelación de vapor o controlados por máquina.

Teniendo en cuenta que los espermatozoides criopreservados se pueden utilizar para generar embriones, todos los procedimientos se deben realizar, si es posible, bajo una campana de clase A en una habitación clasificada (como mínimo D) según las buenas prácticas internacionales de

fabricación. Los métodos y el entorno de congelación deben documentarse si se hallan por debajo de este estándar, pero si son legales no son motivo de rechazo de almacenamiento.

### 3.1. Procedimiento estándar

Aunque los crioprotectores se pueden preparar en el laboratorio, hay que tener en cuenta que el rendimiento de la solución y su seguridad no puede controlarse con precisión.

Normalmente se espera que, cuando estén disponibles, los crioprotectores que se fabrican comercialmente se certifiquen y se usen los homologados para uso terapéutico.

Esto es algo especialmente problemático para los crioprotectores a base de yema de huevo, ya que podrían estar presentes contaminantes del pienso de los pollos o del entorno. Los procedimientos que se describen a continuación son muy difíciles de estandarizar a un nivel adecuado para el uso terapéutico en TRHA en laboratorios locales.

#### Preparación del GEYC

1. A 65 ml de agua purificada estéril añada 1,5 g de glucosa y 1,3 g de citrato de sodio dihidrato tribásico.
2. Añada 15 ml de glicerol y mezcle bien.
3. Añada 1,3 g de glicina. Cuando se disuelva, filtre la solución a través de un filtro de 0,45 µm
4. Añada 20 ml de yema de huevo fresca (preferiblemente obtenida de huevos sin patógenos específicos). Limpie el huevo y retire la cáscara. Perfore la membrana que rodea la yema y aspire con jeringa (se obtendrán aproximadamente 10 ml de yema por cada huevo).
5. Ponga toda la suspensión al baño maría a 56 °C durante 40 minutos, revolviendo de vez en cuando.
6. Compruebe el pH de la solución. Si está fuera del rango 6,8-7,2, descarte la solución y prepare una nueva, por si se han añadido ingredientes o cantidades incorrectas.
7. En esta fase se puede hacer un cultivo bacteriano para las pruebas de esterilidad.
8. En esta fase se pueden hacer pruebas de toxicidad espermática.
9. Distribuya la solución en alícuotas de 2 ml en una zona de trabajo estéril y guárdela a -70 °C.
10. Utilícese en un plazo de tres meses.

Existen crioprotectores similares al GEYC disponibles comercialmente.

#### Adición de crioprotector al semen

1. Descongele el crioprotector, caliéntelo a temperatura ambiente y mezcle. Un calentamiento inicial a 37 °C puede resultar beneficioso.

2. Las altas concentraciones de glicerol son perjudiciales para los espermatozoides. Por tanto, es vital tener mucho cuidado al añadir y mezclar el crioprotector con el semen.
3. Añada un volumen de crioprotector GEYC a dos volúmenes de semen, o gota a gota con remolino, o pipeteando suavemente arriba y abajo, o progresivamente en cinco incorporaciones con una mezcla suave durante unos diez minutos a temperatura ambiente.
4. Después de añadir todo el crioprotector GEYC, incube la mezcla a 30-35 °C durante cinco minutos.

#### Llenado de pajuelas (straws) de semen

1. Las pajuelas de plástico de 0,5 ml son populares por sus propiedades de transferencia de calor y su facilidad de almacenado. Los viales de plástico pueden usarse para almacenar mayores volúmenes.
2. Aspire la mezcla de semen y crioprotector GEYC en pajuelas de plástico de 0,5 ml de semen o colóquelas en crioviales. Algunas pajuelas comerciales cuentan con una «punta de llenado» de un solo uso que evita que el extremo de la pajuela se contamine directamente por semen. Las pajuelas pueden llenarse con un colector en un dispositivo de vacío o con un adaptador que se adapte al extremo de la pajuela. Se llenan hasta que el líquido toca el tapón de algodón, lo que evita que se vacíe cuando se elimina la succión.

#### Sellado de pajuelas de semen

1. Deje un espacio de aire de un centímetro en el extremo inferior tocando la pajuela al lado del contenedor. Si se usa una punta de llenado, se hará de manera automática.
2. Selle con calor las pajuelas por ambos extremos usando un termosellador.
3. Limpie el exterior del recipiente y, a continuación, esterilícelo con alcohol al 70 % (v/v) o con otro descontaminante bacteriano.
4. Asegúrese de que las pajuelas estén etiquetadas con los detalles correctos del paciente/donante y que estén correctamente sellados ambos extremos en esta etapa o antes.

#### Refrigeración y congelación del semen en congeladores programables

Existen congeladores programables que controlan la inyección de vapor de nitrógeno líquido en la cámara de congelación.

1. Coloque las pajuelas o crioviales en un congelador programable y siga las instrucciones del fabricante para activar el programa.
2. Un programa habitual es enfriar las pajuelas a 1,5 °C por minuto, de 20 °C a -6 °C y luego a 6 °C por minuto hasta llegar a -100 °C. Esto tarda unos 40 minutos. Entonces la máquina mantendrá la cámara a -100 °C durante 30 minutos para permitir retrasos antes de transferir las pajuelas al nitrógeno líquido.

3. Se pueden usar otros procedimientos más complicados, según la experiencia en laboratorios individuales.

#### Enfriamiento y congelación manual del semen

Los métodos manuales son menos controlables y estandarizados que los congeladores programables, pero pueden dar resultados adecuados. Hay muchas alternativas a este procedimiento.

1. Coloque las pajuelas en la nevera-congelador (-20 °C) durante 30 minutos y luego sobre hielo seco (-79 °C) durante 30 minutos antes de ponerlas en nitrógeno líquido (-196 °C).
2. Las pajuelas se pueden trasladar del congelador de -20 °C a otro congelador a -70 °C, o en una cesta o copa en una mezcla de vapor de nitrógeno líquido y aire en el borde de un recipiente pequeño de nitrógeno líquido entre -80 °C y -100 °C durante 10-15 minutos, antes de ser depositadas en nitrógeno líquido. También se pueden colocar en un bastidor 10-20 cm por encima del nitrógeno líquido en un recipiente grande y dejarlos durante una hora para desarrollar un gradiente de temperatura por encima del nitrógeno líquido.

#### Congelación rápida por vapor

La congelación manual rápida con vapor también puede dar resultados adecuados.

1. Coloque las pajuelas en vapores de nitrógeno líquido unos 10 cm por encima del nivel de N<sub>2</sub> (-80 °C) durante 8-10 minutos para permitir la congelación inicial lenta. Para estandarizar el proceso se pueden usar cajas comerciales con bastidores flotantes para pajuelas o para crioviales, que mantienen una distancia fija entre las pajuelas y el nitrógeno.
2. Sumerja las pajuelas en nitrógeno líquido inmediatamente después.

#### Almacenamiento de semen congelado

1. Coloque las pajuelas congeladas en tubos de almacenaje de plástico (por ejemplo, mini goblets, tubos en cañuelas o cassetes de pajuelas) e introdúzcalas en goblets de almacenaje más grandes.
2. Almacene los goblets con las pajuelas en contenedores de vacío de nitrógeno líquido (Dewar) o tanques.

#### Transporte de semen congelado

Asegúrese de que se cumplen las normativas locales, nacionales e internacionales sobre el envío de nitrógeno líquido y muestras biológicas humanas.

Los espermatozoides congelados se pueden transportar en tanques de transporte seco disponibles comercialmente enfriados con nitrógeno líquido. En función de las medidas del tanque las temperaturas se mantendrán adecuadamente bajas desde varios días a varias semanas, ya que el nitrógeno líquido se evapora.

## Descongelación de semen congelado

1. Antes de utilizarlas, saque tantas pajuelas o crioviales como sean necesarios del nitrógeno líquido o tanque de vapor y póngalas inmediatamente a 37 °C (en una incubadora, o mejor, en un bloque de calor seco por calefacción de contacto, que puede descontaminarse fácilmente entre usos).
2. Tras la descongelación completa, corte el extremo de la pajuela con unas tijeras estériles y cargue el dispositivo de inseminación (de uso terapéutico) o expulse el contenido para determinar la motilidad postcongelación (para comprobar el proceso de congelación).
3. Elimine el crioprotector añadiendo el medio de cultivo antes de la centrifugación durante diez minutos a 500 g. Saque el sobrenadante y diluya el sedimento de esperma en un medio de cultivo al volumen adecuado.

Si los pacientes deciden descartar su semen criopreservado, las pajuelas o crioviales deben retirarse y descartarse en presencia de un testigo para confirmar que el material es el correcto.

### *3.2. Etiquetado de pajuelas/crioviales y registros*

Todos los procedimientos que implican la identidad de las muestras del donante o del paciente, incluida la recepción de muestras, la preparación y el etiquetado de las pajuelas, la colocación en depósitos y la descongelación de las pajuelas para su uso o descarte, deben realizarse con doble verificación por más de una persona y hay que dejar constancia de ello en los registros del laboratorio. Lo ideal sería que un técnico no procese más de una muestra de semen a la vez.

Debe usarse un código en todas las fichas de datos del laboratorio y en las bases de datos informáticas para mantener el anonimato de los donantes. Se debe guardar la clave del código con la identidad del donante por separado y de manera segura.

Existen muchos sistemas de codificación; lo más importante es tener un código único para cada donante o cliente del que se almacene el esperma. En el caso de clientes/pacientes es importante identificar cada pajuela/criovial con el nombre, fecha de nacimiento, número de hospital y fecha de almacenamiento y cualquier otro requisito según la legislación nacional.

Todas las muestras deben tener un código que permita su identificación durante el almacenaje y la transferencia desde el banco de semen hasta el centro receptor.

### *3.3. Vitrificación*

Cada vez hay más pruebas de que la vitrificación puede resultar un buen método para criopreservar espermatozoides eyaculados. El principio del método es la congelación ultrarrápida de un pequeño volumen de muestra mediante el contacto directo con nitrógeno líquido sin contaminantes, que evitaría la formación de hielo y reduciría los daños osmóticos.

También es posible la vitrificación en pajuela (vitrificación aséptica), que usa un sistema cerrado y no requiere el uso de nitrógeno líquido estéril.



Es posible vitrificar todo el semen o espermatozoides seleccionados usando crioprotectores permeables y no permeables y se pueden usar para criopreservar un único espermatozoide o un número reducido de ellos. Actualmente, sin embargo, la evidencia de mejores parámetros tras la descongelación de vitrificados respecto a los métodos de congelación convencionales es limitada y, por tanto, la vitrificación de espermatozoides debe considerarse un procedimiento experimental (10).

#### Protocolo de vitrificación directa

La vitrificación, junto a los llamados dispositivos «abiertos», requiere una exposición directa de la muestra con el nitrógeno líquido, y esta exposición supone un riesgo de contaminación adicional. Siempre se recomienda el uso de nitrógeno líquido estéril. El procedimiento también puede resultar peligroso para la persona que lo hace, que siempre debe usar equipos de protección adecuados.

#### Materiales

- Crioprotectores
- Nitrógeno líquido estéril
- Una caja para el nitrógeno líquido
- Un colador pequeño para recoger esferas vitrificadas
- Criotubos.

#### Método (11)

1. Después de la dilución con un volumen igual de extensor, el semen se sumerge en nitrógeno líquido sin contaminantes mediante un recipiente de un solo uso.
2. A continuación, las esferas obtenidas se envasan en crioviales, que se sumergen y almacenan inmediatamente en nitrógeno líquido.

#### Protocolo de vitrificación en pajuela

Los métodos de vitrificación en pajuela (vitrificación aséptica) utilizan un sistema cerrado, en pajuelas dobles (unas dentro de otras) completamente cerradas. Son asépticos, sin contacto directo con el nitrógeno líquido y vitrifican volúmenes de muestra mayores (100 ul) con gran número de espermatozoides. Este procedimiento es menos peligroso para la persona que lo lleva a cabo.

#### Materiales

- Pajuelas de 0,5 ml y 0,25 ml
- Medio de vitrificación
- Una caja para nitrógeno líquido
- Tubos cónicos de 10 ml
- Medio de calentamiento.

## Método

1. Prepare 1 ml de medio de vitrificación:
  - medio de lavado de esperma o HTF: 0,495 ml
  - sacarosa 0,5 M disuelta en agua (p. ej., MP Biomedicals, Cat. 152584): 0,495 ml
  - suplemento de suero de dextrano (p. ej., IrvineScientific, Cat. 9301): 0,010 ml
2. Utilice espermatozoides seleccionados (sin plasma seminal) por natación o centrifugación por gradiente de densidad según los parámetros espermáticos y los protocolos del laboratorio local.
3. Después de recuperar los espermatozoides seleccionados, haga un recuento de espermatozoides, concéntrelos por centrifugación (8-10 minutos a 300 g), elimine completamente el sobrenadante y añada la cantidad adecuada de medio de vitrificación para resuspender el sedimento (calculado como sigue):
  - Volumen de suspensión a vitrificar por pajuela (0,25 ml): 100 µl
  - Concentración de esperma por pajuela: 0,1–3,0 x10<sup>6</sup> espermatozoides

El tipo de extensor, la temperatura del crioprotector y el tiempo que las células están expuestas a los crioprotectores son críticos y pueden influir en la eficacia del proceso.

4. Mezcle el sedimento de esperma con el medio de vitrificación justo antes de la vitrificación (temperatura ambiente). No se aconseja exponer a las células al medio de vitrificación durante largos períodos de tiempo.
5. Una pajuela de 0,25 ml debe cortarse a dos tercios de su longitud original. A continuación, se coloca horizontalmente y se dispensa una alícuota de 100 µl, con una pipeta, en el extremo abierto. Durante las siguientes etapas es imprescindible que se mantenga la posición horizontal para que no se pierda la alícuota.
6. La pajuela se introduce entonces dentro de otra pajuela de 0,5 ml, que se sella térmicamente por ambos extremos. La pajuela debe sumergirse inmediatamente en nitrógeno líquido durante cinco segundos, en posición horizontal con ayuda de unas pinzas, y almacenarse en nitrógeno líquido.

## Calentamiento tras el proceso de vitrificación

1. Prepare el medio de calentamiento.
2. Descongele el contenido de las pajuelas/criviales en un medio precalentado a 42–43 °C.

# Anexo 2: Estrategia de búsqueda y registros identificados según fuente consultada

## Búsqueda definitiva en diferentes bases de datos bibliográficas (N=28)

Bdd	Resultados
Ovid (Medline)	3
EMBASE	12
Cochrane	1
Scopus	6
WoS	5
Epistemonikos	1

Registros recuperados: 28

Registros únicos: 17

Medline (OVID)

Ovid MEDLINE(R) and Epub Ahead of Print, In-Process, In-Data-Review & Other Non-Indexed Citations and Daily 1946 to June 22, 2022

Resultados: 3

Núm.	Búsqueda	Resultados
1	Vitrification/	2211
2	"vitrification*".ab,ti.	4769
3	1 or 2	5199
4	exp Spermatozoa/	71954

Núm.	Búsqueda	Resultados
5	Semen Preservation/	6270
6	Sperm Banks/	512
7	(semen* or sperm*).ab,ti.	160550
8	or/4-7	170734
9	(Home or "home-made" or "home made" or offsite).ab,ti.	259559
10	("Sperm Freeze(K)it" or "sperm freezing kit" or "sperm freeze kit").tw.	0
11	9 or 10	259559
12	3 and 8 and 11	3

## Embase

Resultados: 12

Núm.	Búsqueda	Resultados
#1	'vitrification'/exp	7477
#2	vitrification*:ab,ti	7820
#3	#1 OR #2	9176
#4	'spermatozoon'/exp OR 'sperm preservation'/exp OR 'sperm bank'/de	56182
#5	semen*:ab,ti OR sperm*:ab,ti	192339
#6	#4 OR #5	199983
#7	home:ab,ti OR 'home-made':ab,ti OR 'home made':ab,ti OR offsite:ab,ti	373203
#8	'sperm freeze(k)it' OR 'sperm freezing kit' OR 'sperm freeze kit'	1
#9	#7 OR #8	373203
#10	#3 AND #6 AND #9	12

## Cochrane

Resultados: 1

Núm.	Búsqueda	Resultados
#1	MeSH descriptor: [Vitrification] explode all trees	48
#2	(vitrification*):ti,ab,kw	453
#3	#1 or #2	453
#4	MeSH descriptor: [Spermatozoa] explode all trees	479
#5	MeSH descriptor: [Semen Preservation] this term only	30
#6	MeSH descriptor: [Sperm Banks] this term only	3
#7	(semen* or sperm*):ti,ab,kw	7855
#8	(12-#7)	7855
#9	(Home or "home-made" or "home made" or offsite or "Sperm Freeze(K)it" or "sperm freezing kit" or "sperm freeze kit"):ti,ab,kw	50530
#10	#3 and #8 and #9	1

## Scopus

Resultados: 6

TITLE-ABS-KEY((Vitrification\*) AND (Semen\* OR Sperm\*) AND (Home OR "home-made" OR "home made" OR offsite OR "Sperm Freeze(K)it" OR "sperm freezing kit" OR "sperm freeze kit"))

## Web of Science

Resultados: 5

Núm.	Búsqueda	Resultados
#1	TS=(vitrification*)	13884
#2	TS=(semen* OR sperm*)	220549
#3	TS=(Home OR "home-made" OR "home made" OR offsite)	509759
#4	ALL=("Sperm Freeze(K)it" OR "sperm freezing kit" OR "sperm freeze kit")	1
#5	#4 OR #3	509759
#6	#5 AND #2 AND #1	5

## Epistemonikos

Resultados: 1

(title:(title:(Vitrification\*) AND (Semen\* OR Sperm\*) AND (Home OR "home-made" OR "home made" OR offsite OR "Sperm Freeze(K)it" OR "sperm freezing kit" OR "sperm freeze kit")) OR abstract:(Vitrification\*) AND (Semen\* OR Sperm\*) AND (Home OR "home-made" OR "home made" OR offsite OR "Sperm Freeze(K)it" OR "sperm freezing kit" OR "sperm freeze kit")))) OR abstract:(title:(Vitrification\*) AND (Semen\* OR Sperm\*) AND (Home OR "home-made" OR "home made" OR offsite OR "Sperm Freeze(K)it" OR "sperm freezing kit" OR "sperm freeze kit")) OR abstract:(Vitrification\*) AND (Semen\* OR Sperm\*) AND (Home OR "home-made" OR "home made" OR offsite OR "Sperm Freeze(K)it" OR "sperm freezing kit" OR "sperm freeze kit"))))

# Bibliografia

1. Nijs M, Creemers E, Cox A, Janssen M, Vanheusden E, Castro-Sanchez Y, et al. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(2):202-6.
2. Guan HT, Zheng Y, Wang JJ, Meng TQ, Xia W, Hu SH, et al. Relationship between donor sperm parameters and pregnancy outcome after intrauterine insemination: analysis of 2821 cycles in 1355 couples. *Andrologia*. 2016;48(1):29-36.
3. Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertil Steril*. 2006;86(3):721-2.
4. Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril*. 2005;84(4):1017.
5. Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Syst Biol Reprod Med*. 2015;61(1):1-12.
6. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, . Geneva: World Health Organization; 2021 [cited 2022 17-10]. Available from: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1358672/retrieve>.
7. Institut Marquès. Sperm freeze(K)it. Home sperm freezing kit. <https://institutomarquescom>. Barcelona: Institut Marquès; 2020.
8. Institut Marquès. Kit de congelación de semen en casa. Instrucciones para la congelación de semen en casa. Barcelona: Institut Marquès,.
9. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaili V, et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(3):327-39.
10. Li YX, Zhou L, Lv MQ, Ge P, Liu YC, Zhou DX. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019;233:84-92.
11. Isachenko V, Rahimi G, Mallmann P, Sanchez R, Isachenko E. Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness. *Andrology*. 2017;5(6):1055-63.

Salut/  Agència de Qualitat i Avaluació  
Sanitàries de Catalunya