



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

**Instituto Nacional de Perinatología
Isidro Espinosa de los Reyes
Subdirección de Medicina Reproductiva**

**RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA
DESPUÉS DE LA CONGELACIÓN
EN MUESTRAS CON DIFERENTE
CALIDAD SEMINAL.**

T E S I S

Para obtener el Título de:

**ESPECIALISTA EN BIOLOGIA DE LA
REPRODUCCION HUMANA**

PRESENTA

DR. ROBERTO FELIPE BACARREZA VILLALBA

**DR. FERNANDO GAVIÑO GAVIÑO
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACION EN
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION HUMANA**

**DR. ARMANDO JUAREZ BENGOA
DIRECTOR DE TESIS**

MEXICO, D.F. 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACION DE TESIS

**RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA DESPUÉS DE LA CONGELACIÓN EN
MUESTRAS CON DIFERENTE CALIDAD SEMINAL.**

**DR. SALVADOR GAVIÑO AMBRIZ
DIRECTOR DE ENSEÑANZA**

**DR. FERNANDO GAVIÑO GAVIÑO
SUBDIRECTOR DE MEDICINA REPRODUCTIVA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACION**

**DR. ARMANDO JUAREZ BENGOA
DIRECTOR DE TESIS**

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	6
RECONOCIMIENTOS	7
RESUMEN:	8
CAPITULO I	
Introducción:	9
CAPITULO II: MARCO TEORICO	
Antecedentes históricos	10
Base físicas de la criopreservación	11
Sustancias diluyentes	12
Crioprotectores	14
Cambios celulares	16
Daño membranal	17
Daño al DNA	19
Indicaciones para la criopreservación	21
Resultados reportados en la criopreservación	22
Técnica de criopreservación usada actualmente en el INPerIER	24
Número de espermatozoides requeridos para técnicas de reproducción Asistida	25
CAPITULO III: MATERIAL Y METODOS	
Objetivo	27
Tipo de diseño	27
Universo, lugar y duración	27
Criterios de inclusión	27
Variables en estudio	28
Metodología	28
CAPITULO IV:	
Resultados	29
CAPITULO V:	
Discusión	32
CAPITULO VI:	
Conclusiones	34

INDICE DE TABLAS Y GRAFICAS

TABLAS:	
TABLA 1 Parámetros seminales en la espermatobioscopía de varones sanos con paternidad comprobada antes de la congelación	35
TABLA 2 Parámetros seminales en la espermatobioscopía de varones sanos con paternidad comprobada después de la congelación.	35
TABLA 3 Diferencia entre el total de células móviles (TCM) antes y después del congelado, porcentajes de pérdidas y porcentajes de recuperación de espermatozoides en varones sanos con fertilidad comprobada después del congelado.	36
TABLA 4 Diferencia entre el porcentaje de formas normales antes y después del congelado y el porcentaje de cambios en la morfología de las muestras seminales de varones sanos con fertilidad comprobada.	36
TABLA 5 Diferencia entre el porcentaje de movilidad A+B antes y después del congelado y el porcentaje de cambios en la movilidad A+B de las muestras seminales de varones sanos con fertilidad comprobada.	37
TABLA 6 Parámetros seminales en la espermatobioscopía de pacientes con factor masculino de infertilidad antes del congelado.	37
TABLA 7 Parámetros seminales en la espermatobioscopía de pacientes con factor masculino de infertilidad después del congelado.	38
TABLA 8 Diferencia entre el total de células móviles (TCM) antes y después del congelado, porcentajes de pérdidas y porcentajes de recuperación de espermatozoides en pacientes con factor masculino de infertilidad después del congelado.	38
TABLA 9 Diferencia entre la densidad antes del congelado y después del descongelado y % de los cambios de la densidad de las muestras seminales de pacientes con factor masculino de infertilidad.	39
TABLA 10 Diferencia entre el porcentaje de formas normales antes del congelado y después del descongelado y % de los cambios en la morfología normal de las muestras seminales de pacientes con factor masculino de infertilidad.	39
TABLA 11 Diferencia entre el porcentaje de movilidad A+B antes del congelado y después del descongelado y % de los cambios en la movilidad A+B de las muestras seminales de pacientes con factor masculino de infertilidad.	40

GRAFICAS:	
GRAFICA 1 Correlación entre el porcentaje de espermatozoides recuperados de varones sanos con fertilidad comprobada con el total de células móviles antes del congelado	41
GRAFICA 2 Correlación entre el porcentaje de espermatozoides perdidos y el total de células móviles antes del congelado en varones sanos con fertilidad comprobada	41
GRAFICA 3 Correlación entre el porcentaje de espermatozoides recuperados con el total de células móviles antes del congelado en pacientes con factor masculino de infertilidad	42
GRAFICA 4 Correlación entre el porcentaje de espermatozoides recuperados con el total de células móviles antes del congelado en pacientes con factor masculino de infertilidad	42
BIBLIOGRAFIA	43

DEDICATORIA

A todos los pacientes infértiles de mi querido México, su contagiosa esperanza en resolver sus problemas de infertilidad me motivaron y alimentaron mis sueños de aportar con mi grano de arena en este proceso.

A mis padres, por que son lo más bonito que tengo.

RECONOCIMIENTOS

Dr. Armando Juárez Bengoa. Quien con la paciencia de un padre me guió durante todo el trabajo.

Dra. Josefina Lira. Facilitó el contacto y reclutamiento de hombres sanos. Fue su intuición y trato amable con los pacientes que ayudaron a este proceso.

Bióloga Xóchitl Elena Flores y Bióloga Heidi Serrano V. Procesaron las muestras y dieron los números para analizarlos.

RESUMEN

El inicio de la criopreservación tiene una historia de aproximadamente 200 años. Pero son los últimos 50 años donde se han presentado los avances más importantes en la recuperación espermática de muestras sometidas a criopreservación debido al descubrimiento e incorporación de los agentes criopreservantes. Con el avance de las técnicas de reproducción asistida, el uso de gametos congelados ha ampliado cada vez más las fronteras de la reproducción humana ofreciendo la posibilidad de concebir en situaciones que hasta hace unos 20 años hubiese sido realmente imposible.

De las técnicas de criopreservación descritas hasta la fecha, la técnica de TEST yolk/glicerol nitrógeno líquido -196°C es la que mejores resultados ha mostrado.

En este estudio comparamos los porcentajes de recuperación espermática después de la congelación de 15 muestras con diferente calidad seminal con técnica TEST Yolk/glicerol nitrógeno líquido a -196°C.

En varones sanos con paternidad comprobada en promedio se perdió el 63.54% y se recuperó 36.46% del total de células móviles (TCM). Se perdió el 2.37% de las formas normales. Así, las muestras seminales que tienen una mayor cantidad del total de células móviles antes del congelado, mayor será el porcentaje de recuperación espermática. Consecuentemente a menor total de células móviles mayor será el porcentaje de pérdidas de espermatozoides.

En las muestras de varones infértiles evidenciamos una pérdida del 71.15% del total de células móviles (TCM) y una recuperación en el TCM del 28.84%. Se recuperó solo 13.71% de la densidad espermática y el 1.57% de formas normales. Pues mientras menor sea el total de células móviles de la muestra en el precongelado, menor será el porcentaje de recuperación espermática y mayor será el porcentaje de pérdidas de espermatozoides.

El total de células móviles en las muestras que van a ser sometido a criopreservación podía ser uno de los parámetros más importantes para correlacionar los porcentajes de recuperación espermática en el descongelado.

Los hallazgos del presente estudio son preliminares. Es importante contar con una población de estudio mayor para inferir conclusiones apoyadas en pruebas estadísticas adecuadas.

CAPITULO I:

INTRODUCCION

Desde tiempos de la alquimia, ha sido un gran sueño de la humanidad detener el tiempo de la vida, detener el envejecimiento y permanecer joven por siempre. Actualmente esto no se puede realizar, pero algunas células y tejidos pueden ser conservados con la ayuda de la crio tecnología.

A partir del momento de la fertilización, el proceso de la vida marcha a través del ritmo del reloj biológico. El uso de la criopreservación nos da la posibilidad de interferir con este reloj deteniendo los procesos biológicos que ocurren. La criopreservación de células implica su congelación y almacenamiento a temperaturas en las cuales todos sus procesos metabólicos son detenidos. En la práctica, las células son congeladas y almacenadas a temperaturas de -196°C en nitrógeno líquido.

Gracias al avance en las técnicas de reproducción asistida el uso de gametos congelados ha ampliado cada vez más las fronteras de la reproducción humana ofreciendo la posibilidad de concebir en situaciones que hasta hace unos 20 años atrás hubiesen sido realmente imposibles. Las indicaciones de la criopreservación de gametos son múltiples y van desde el almacenamiento para cumplir un deseo reproductivo posterior, sobre todo si el individuo va ser sometido a tratamientos que podrían alterar la calidad seminal, hasta las crecientes formaciones de bancos de semen de donantes para utilizar las muestras en parejas cuya afectación masculina es grave e irreversible.

Si bien el espermatozoide y el ovocito son simplemente dos células. Desde el punto de vista biológico, ambas están relacionadas con una elevada especialización en su estructura y función por el hecho de lograr reconstituir un organismo entero a través de su unión. Por este hecho la criopreservación de espermatozoides, óvulos y embriones es motivo de continua investigación con el propósito de entender y describir los procesos y fenómenos involucrados, así como sus efectos en los resultados reproductivos.

II: MARCO TEORICO

ANTECEDENTES HISTORICOS:

La investigación sobre la preservación de semen ha tenido una historia de más de dos siglos. En 1776 Spallanzani fue el primero en reportar el mantenimiento de la movilidad del espermatozoide humano después de su exposición a bajas temperaturas. En 1866 se sugiere la incorporación de bancos de esperma congelado¹, pero la mayor parte de los trabajos se hicieron durante las cuatro últimas décadas². Polge en 1949, descubre la eficacia del glicerol como agente criopreservante para guardar espermatozoides de aves de corral. En 1950 se reportaron embarazos con semen criopreservados de animales principalmente domésticos⁵.

Los reportes sobre criopreservación comenzaron hacia 1953 por Sherman³. En un inicio se creyó que resultaría mucho más sencillo criopreservar una célula pequeña, prácticamente sin citoplasma, como el espermatozoide, que a una célula más grande con un metabolismo más complejo en estado de quiescencia, como el óvulo⁴.

A partir de 1970 se empiezan a desarrollar los criobancos de espermias humanas, los cuales necesitaban estandarización, especialmente en los Estados Unidos de Norteamérica donde comercializan y universalizan los bancos de espermias que se establecieron para permitir fertilización después de una vasectomía. La primera asociación de bancos de esperma humano fue establecido en Francia en el Center d'Etude et de Conservation du Sperme en 1973, seguida por la creación de la Sociedad Americana de Bancos de Tejido en 1976, donde también cubría la criopreservación de gametos. El creciente uso de semen humano criopreservado llevó al primer encuentro internacional de criopreservación de semen humano, llevado a cabo en París en 1978¹.

Por otro lado, en 1990 publican el nacimiento de cachorros de ratones concebidos por inseminación artificial y fertilización *in vitro* con semen congelado^{6,7}.

En 1995 Tedder et al⁸ reportaron la fuga de muestras de médula ósea de la bolsa de criopreservación la cual contaminó el nitrógeno líquido con virus de la hepatitis B y su subsecuente transmisión a pacientes después de su trasplante. Muchos estudios posteriores confirmaron que algunos agentes infecciosos sobreviven y contaminan otras muestras preservadas en nitrógeno líquido⁹ por lo que en 1999 la Sociedad Británica de Andrología recomendó guías para asegurar la criopreservación de donantes de gametos¹⁰.

La viabilidad del material biológico almacenado a -196°C (temperatura del nitrógeno líquido) es independiente del periodo de almacenamiento. Las muestras más antiguas disponibles son de espermatozoides de bovinos que se almacenaron por más de 50 años sin mostrar reducción en la viabilidad¹.

BASES FISICAS DE LA CRIOPRESERVACION:

Pese a que el agua líquida es esencial para la estructura y función de las células vivas, su transformación al estado sólido por efecto de la criopreservación puede ser letal. Sin embargo la congelación puede preservar las células por largos periodos de tiempo en estados viables atenuando y deteniendo algunas reacciones bioquímicas o acelerando otras. Contrariamente a la usual impresión, el desafío de la célula no es su capacidad para soportar el almacenamiento a muy bajas temperaturas, sino más bien su capacidad de sobrevivir en una zona intermedia de temperatura que oscilan entre -15°C y -60°C . La célula debe atravesar esta zona térmica en dos ocasiones una durante la congelación y otra al ser descongelada.

La refrigeración más usada para el almacenamiento a bajas temperaturas son los sistemas acuosos de nitrógeno líquido a -190°C . No ocurren reacciones térmicas a esa temperatura, una razón es porque no existe agua líquida por debajo de -130°C . Los únicos estados físicos del agua que existen a esa temperatura son en forma de cristales o vitriosos y en ambos estados la viscosidad es muy alta ($>10^{13}$ poises) de manera que su difusión es insignificante. Además a -190°C no hay suficiente energía térmica para las reacciones químicas, la única reacción que puede ocurrir son eventos fotofísicos como la formación de radicales libres y la ruptura de macromoléculas resultado directo de radiación ionizante proveniente del medio ambiente. Durante un periodo suficientemente largo, esa ionización directa puede producir suficientes rupturas u otros daños al DNA que pueden ser deletéreos después del recalentamiento a temperaturas fisiológicas, sobre todo porque no pueden ocurrir reparaciones enzimáticas a muy bajas temperaturas.

El agua y las soluciones acuosas tienen una fuerte tendencia a la súper congelación cuando la temperatura desciende por debajo de su punto de fusión, antes que ocurra la formación del hielo. Por ejemplo, mientras que el punto de fusión del hielo es de 0°C , la temperatura del agua puede reducirse significativamente por debajo de los 0°C antes que se presente la formación de hielo. En condiciones controladas el agua podría congelarse aproximadamente a -40°C , después de esta temperatura la conversión de la enucleación del hielo es inevitable.

Para evitar los efectos perjudiciales de la súper congelación en la célula y en particular en el espermatozoide, la formación de hielo es iniciada de forma controlada. Esto es comúnmente referido como "seeding" (sembrado) aunque estrictamente este término se refiere a la introducción de cristales bajo la solución súper congelante.

La formación controlada del hielo durante la criopreservación se reconoce como el factor clave para determinar la viabilidad del espermatozoide en la descongelación. En la práctica normal, la congelación se realiza a temperaturas de -7°C , manteniendo a esta temperatura el equilibrio térmico. Después se inicia la formación de hielo por contacto en la parte exterior del contenedor. La deshidratación celular ocurre durante la subsecuente congelación lenta. Debajo de los -5°C , las células y su medio circundante permanecen sin congelar, ambos debido a la súper congelación y por efecto de la solución crioprotectora.

Entre -5°C y -15°C ocurre la formación de hielo en el medio externo (tanto espontáneamente como resultado de la siembra) pero el contenido de la célula permanece sin congelar presumiblemente por que la membrana plasmática bloquea el crecimiento de cristales dentro del citoplasma. El agua súper congelada en el interior de la célula tiene un mayor potencial químico que el agua de la parte de la solución súper congeladora fuera de la célula y en respuesta a esta diferencia de potencial, el agua fluye fuera de la célula y se congela externamente.

Los eventos físicos subsecuentes en la célula dependen de la velocidad de congelación. Si la congelación es suficientemente lenta, la célula es capaz de perder agua rápidamente por ósmosis. La concentración intracelular de solutos es suficiente para eliminar el efecto de la súper congelación y mantener el potencial químico del agua intracelular en equilibrio con el agua extracelular. El resultado es que la célula se deshidrata y no se congela intracelularmente. Pero si la célula es congelada rápidamente, ésta no es capaz de perder suficiente agua rápidamente para mantener el equilibrio. Resultando en un aumento del efecto de la súper congelación y eventualmente alcanzar el equilibrio con la consiguiente congelación intracelular y la formación del hielo intracelular lleva a la muerte celular.

SUSTANCIAS DILUYENTES

La información referente a los sistemas de diluyentes es sin duda la más ampliamente estudiada. Un aspecto de gran importancia es el sistema o compuestos químicos que forman el diluyente base. Generalmente un diluyente, está formado por una fracción ácida, otra básica y un compuesto que aporte energía a la célula espermática hasta el momento en que sea congelada. Todas estas soluciones deben estar a una presión iso-osmótica con el plasma seminal y la combinación de ellas debe mantenerse a un pH neutro. El empleo de medios diluyentes-conservadores permite prolongar la viabilidad de la célula espermática y optimizar el aprovechamiento de los eyaculados obtenidos.

Al iniciar el uso de estas sustancias se informó que la inclusión de la yema de huevo en el diluyente prolongaba la viabilidad del semen. A partir de entonces, este compuesto se ha convertido en un constituyente común de los diluyentes seminales que van a ser sometidos a criopreservación.

Los diluyentes deben cumplir requisitos de pH, amortiguación, osmolaridad y fuerza iónica. Además de contener una fuente de energía para el espermatozoide, no deben deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso y también deben proporcionar a la célula espermática protección frente a los efectos de la temperatura, refrigeración, congelación y descongelación.

La mayoría de los diluyentes recomendados para la criopreservación del semen deben ser hipertónicos con respecto al plasma seminal. Esta función la cumple el glicerol, ya que induce mayor deshidratación del espermatozoide y en consecuencia reduce el volumen de agua intracelular y por tanto el hielo formado durante la congelación.

Las sustancias o compuestos químicos a seleccionar para la formación de un diluyente pueden ser diversas. Se han utilizado sustancias tampones, aquellas en cuya estructura está implícito un pK fuerte; es decir, una resistencia natural de la solución a variar en pH a pesar de los productos de catabolismo que puedan ser producidos por las propias células espermáticas. Las más importantes de este grupo son los compuestos amido-orgánicos¹², cuyos nombres empiezan a ser familiares como el TES, TRIS, HEPES, BES, MOPS, BICINE, PIPES. También han sido ampliamente utilizados aquellos formados en base a la fuerza iónica de sus compuestos, o bien en base al aporte de proteínas, incluyendo en estos grupos el citrato, yema de huevo y leche descremada. En cuanto al pH óptimo de los diluyentes empleados para la congelación de las células espermáticas de mamíferos, debe ser cercano a la neutralidad. Por esta razón, para poder mantener un pH adecuado es necesario utilizar soluciones tampones¹².

La adición de azúcares a los diluyentes para la congelación de semen tiene un efecto beneficioso sobre la vitalidad e integridad acrosómica de las células espermáticas. Estos azúcares aportan la energía necesaria para que el espermatozoide desarrolle sus procesos metabólicos, habiéndose verificado que los espermatozoides únicamente pueden glicosilar la glucosa, fructosa y manosa. Además los azúcares actúan como sustancias crioprotectoras contribuyendo a mantener el equilibrio osmótico. En este sentido, son los azúcares de elevado peso molecular (disacáridos y trisacáridos), los que mayor protección aportan al situarse recubriendo la membrana plasmática y disminuyendo los efectos lesivos de la concentración de solutos.

Es preferible la profilaxis y mantener un estado sanitario adecuado en los donantes que añadir al diluyente antibióticos de amplio espectro¹², aunque este hecho aún es debatible.

CRIOPROTECTORES:

Las lesiones debidas a la criopreservación sobre las estructuras celulares pueden atenuarse mediante la inclusión de agentes crioprotectores en la elaboración de los diluyentes. Estas sustancias protegen durante los procesos de congelación y descongelación.

Numerosas sustancias han sido identificadas por su acción crioprotectora y muchas de ellas se han utilizado con espermatozoides. Los crioprotectores pueden clasificarse en función de su permeabilidad para las membranas plasmáticas como crioprotectores penetrantes (metanol, glicerol, dimetilsulfóxido, etilen glicol¹², propanodiol y acetamida) y los crioprotectores no penetrantes (azúcares, lipoproteínas de la yema de huevo y proteínas de alto peso molecular). El mecanismo de acción de estos compuestos no es totalmente conocido. Los crioprotectores penetrantes se introducen en la célula de forma uniforme provocando la deshidratación celular por sustitución del agua intracelular y evitando así el incremento de la concentración de solutos y formación de cristales de hielo, siendo más efectivos cuando las velocidades de congelación son lentas. Por el contrario los crioprotectores no penetrantes se sitúan recubriendo la membrana plasmática e inducen la formación de cristales de hielo alrededor de la misma, siendo más efectivos en congelaciones rápidas.

Los crioprotectores más empleados son el glicerol y la yema de huevo de gallina, la cual debe su efecto protector a las lipoproteínas de baja densidad. Estas sustancias recubren las células espermáticas a modo de camisa reversible durante la congelación y descongelación por una unión lábil que se realiza entre los lípidos de la yema y las lipoproteínas de la membrana plasmáticas, bloqueando así la entrada de iones de calcio a la célula. El glicerol, a pesar de ser comúnmente empleado en la congelación de semen, presenta cierto grado de toxicidad para la propia célula espermática, por ello, la concentración de glicerol utilizada se tiende a reducir hasta a un 4 a 8%. Recientemente se ha demostrado que el glicerol tiene una acción desestabilizadora sobre la membrana plasmática que induce la reacción acrosómica del espermatozoide¹².

Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y en consecuencia una menor concentración de electrólitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, estos compuestos incorporados a los diluyentes producen un estrés transitorio pero importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides. La magnitud de este hecho está íntimamente relacionada con la capacidad penetrante de los crioprotectores¹³. El glicerol produce estrés osmótico, se ha observado que la hiperosmolaridad producida por este compuesto posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica¹⁴. Este estrés puede reducirse mediante la incorporación de glicerol por etapas en el proceso de criopreservación¹³, lo que permite aumentar considerablemente la proporción de espermatozoides sobrevivientes a la

descongelación. Además del glicerol existen otros compuestos que poseen propiedades crioprotectoras como el etilenglicol¹⁵.

Los espermatozoides son también sensibles a los efectos tóxicos de otros crioprotectores. Es así que los compuestos utilizados habitualmente para criopreservar otras células (Ej. Dimetilsulfóxido DMSO) resultan menos satisfactorios para la criopreservación espermática¹⁶, pues se ha observado que el dimetilsulfóxido es más tóxico para los espermatozoides humanos que el glicerol, recuperándose un menor porcentaje de espermatozoides móviles a la descongelación¹⁷.

El éxito de la criopreservación se ve afectado por el agente criopreservante y por la técnica de la congelación¹⁸.

Varios agentes criopreservantes son usados para disminuir el daño al espermatozoide; la mayoría de los medios utilizados son en base a glicerol y/o yema de huevo, test buffer yema de huevo, una mezcla yema de huevo glicerol-antibiótico de gentamicina y solución buffer, probados en muchos estudios y mostraron buena calidad espermática posterior a la descongelación¹⁹. SpermCryo, un medio de congelación basado en glicerol y glucosa, es ofertado como una posible alternativa para reemplazar al test buffer yema de huevo²⁰. El segundo campo de interés es la técnica en el proceso de criopreservación. Actualmente esto ocurre desde el congelado lento automático, el congelado rápido en vapor de nitrógeno líquido y hasta la vitrificación recientemente propuesta^{20,21}.

El glicerol ha sido el primer crioprotector utilizado para el semen humano. A pesar de ser responsable de la reducción de la movilidad espermática tras la descongelación debido a su toxicidad, sigue siendo el más ampliamente usado en la criopreservación de espermatozoides ya que éstos sufren un daño osmótico cuando no se utiliza.

Lo más frecuente es la utilización de compuestos asociados al glicerol, empleándose un sistema tampón formado por TES (N-tris (hidroximetil) metil 2 amino etano ácido sulfónico) y TRIS (Hidroximetil aminometano), llamado TEST que contiene además citrato y/o yema de huevo, con porcentajes variables de glicerol. Otros contienen glicerol, glicina y sucrosa o yema de huevo, citrato dextrosa y glicina como agentes crioprotectores. Se demostró mayor movilidad progresiva y longevidad post descongelación cuando se utilizaban tampones TEST-citrato-glicerol-yema de huevo⁹⁹.

Aún que el semen humano no puede ser congelado con éxito en medios sin glicerol, la concentración óptima del mismo para el mantenimiento de la máxima fertilidad post descongelación difiere entre varios medios y debe ser determinada empíricamente¹⁰⁰.

CAMBIOS CELULARES DURANTE LA CRIOPRESERVACION:

Tanto el espermatozoide como el oocito, pese a tratarse de una sola célula, ambos muestran porcentajes sensibles al estrés de la criopreservación. Ello podría estar

relacionado con la elevada especialización de estas células en su estructura y su función de reconstituir todo un organismo a partir de dos células.

Mediante la crio preservación es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo potencialmente fértil en el tiempo²². Es necesario comprender a qué tipo de estrés se ven sometidos los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación así como la manera en que las células responden a las agresiones fisicoquímicas medioambientales. Los espermatozoides descongelados móviles, con membranas intactas no mantenían su viabilidad y capacidad fecundante durante tanto tiempo como los espermatozoides del semen fresco²³. El proceso de criopreservación usualmente produce daño en un gran número de espermatozoides, quedando viable sólo una pequeña fracción de células espermáticas después de la descongelación del semen.

Esta disminución se relaciona tanto con la muerte de las células que no soportan el estrés del proceso así como la disfunción no letal provocada en una parte de la población sobreviviente. Uno de los factores importantes para lograr mayores tasas de embarazo usando semen congelado frente al uso de semen fresco está relacionado con la calidad del semen obtenida en el momento de la descongelación²⁴. Durante el proceso de congelación-descongelación se pierde aproximadamente 50% de la población inicial de espermatozoides debido a los efectos de la criopreservación sobre las membranas, citoesqueleto, aparato motor y núcleo del espermatozoide^{22,25,26}.

La reducción de la fertilidad asociada al semen que ha sufrido procesos de congelación y descongelación, se atribuye en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas espermáticas^{2,25,27}.

Es generalmente aceptado que la técnica de congelación provoca algún tipo de daño, que incluye la pérdida de la fluidez e integridad de la membrana celular por estrés oxidativo con importante peroxidación de lípidos, fragmentación del DNA, modificaciones del cito esqueleto, daño a organelos, acrosoma y mitocondrias²⁸.

En general rápidos congelaciones conllevan una elevada lisis celular por deshidratación celular, en tanto que una congelación lenta aumenta la formación de cristales intracelulares²⁰. Desde 1949 se han desarrollado diversos tipos de crioprotectores para disminuir el daño.

DAÑO MEMBRANAL:

En general se admite que tanto la motilidad como la capacidad fertilizante del espermatozoide congelado tienen correlación con el daño que ocurre con la célula espermática²², éste incluye la pérdida de la fluidez y la integridad membranar^{29,30}.

El estrés oxidativo provoca la peroxidación de lípidos^{31,32}, la fragmentación del DNA y modificaciones en el citoesqueleto^{33,34}. Los cambios en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática causada por el shock térmico induce la pérdida de muchos componentes en la célula espermática, resultando en una disminución de la actividad metabólica²⁸. Durante este proceso se pierden algunas proteínas receptoras citoplasmáticas de membrana³⁵⁻³⁶.

Tomando en cuenta que la criopreservación puede provocar daño a diferentes componentes celulares como la membrana plasmática y el citoesqueleto se ha estudiado a la P34H y alfa tubulina como marcadores específicos de estos compartimientos. La P34H es una proteína receptora de membrana, miembro de la familia de proteínas deshidrogenasa/reductasa de cadena corta³⁸ que es incorporada en la membrana plasmática del capuchón acrosomal cuando el espermatozoide atraviesa el epididimo³⁷. Éste juega un papel clave en la unión a la zona pelúcida del ovocito. *In vitro* un antisuero contra esta membrana impide que el espermatozoide se una a la cubierta extracelular del huevo³⁹. Además algunos casos de infertilidad masculina humana podrían explicarse por la ausencia de P34H en la superficie del espermatozoide. Por lo tanto esta proteína se ha propuesto como marcador de fertilidad³⁷.

Los mayores componentes de los microtúbulos y centrosoma de la cola del espermatozoide son las subunidades polimerizadas alfa y beta tubulina. Ellos están por consiguiente implicados en la motilidad espermática así como en los eventos tempranos de fertilización. En las células vivas hay un equilibrio entre la tubulina polimerizada y los heterodímeros solubles alfa y beta, de manera que estas dos formas están en un proceso constante de amoldamiento⁴⁰. Con la refrigeración y la presencia de calcio se produce despolimerización en los microtúbulos^{41,42}. Aunque la despolimerización en frío ha sido ampliamente estudiado en oocitos^{43,44}. No está claro si microtúbulos y centrosomas de la cola del espermatozoide son afectados por las mismas condiciones.

Las células vivas sometidas a criopreservación están sujetas a dos factores que son responsables del daño de manera secuencial, la baja temperatura y la cristalización intracelular y extracelular de agua. Estos factores tienen efectos deletéreos con cambios en la composición y posición de los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide^{45,46}. Estas agresiones a la membrana plasmática del espermatozoide son en parte responsables de la fuga desde la célula de algunos componentes intracelulares, provocando una disminución de la actividad metabólica espermática. Por lo tanto, la membrana citoplasmática, proteínas receptoras de membrana y enzimas así como otros componentes son crio-eludidas por la célula espermática^{35,47,48,49}.

Recientemente se ha reportado una disminución en la membrana plasmática de la proteína P25b después de la criopreservación en espermias de toros³⁶. Debido a que P25b y P34H son proteínas homólogas en toros y humanos respectivamente por lo que son considerados marcadores de fertilidad⁵⁰. Se ha hipotizado que la criopreservación de espermatozoides humanos podría cambiar los niveles de P34H. Se encontró que después del proceso de congelación/descongelación del semen humano existía una disminución de los niveles de P34H en un 55% comparado con el espermia fresco control²⁸. Así, esta disminución en la detección P34H en la criopreservación es probablemente más una consecuencia del daño inducido a la membrana celular de espermia que el daño celular total²⁸. Como el espermatozoide deficiente en P34H es incapaz de unirse a la zona pelúcida del ovocito³⁷, niveles bajos de P34H observados en semen criopreservado podrían correlacionarse con la pérdida de la fertilidad del semen humano sometidos a criopreservación.

La membrana celular no es el único blanco de daño en criopreservación de células vivas. La congelación causa disrupción de las estructuras que contiene el microtúbulo sensibles al frío como el huso meiótico^{33,43,44,51,52}. Los microtúbulos están compuestos por tubulina, proteína heterodímera de 110 KDa compuesta de dos sub unidades (alfa y beta). La estructura monomérica de alfa y beta son básicamente idénticas. Similares en peso molecular (55 KDa) y los dos contienen dominios de unión GTP en sus regiones amino terminal, sin embargo solo la sub unidad beta hidroliza al GDP durante el proceso de polimerización⁵³. Una vez que las moléculas de tubulina son hidrolizadas dentro los microtúbulos, ellas podrían ser sometidos a una variedad de modificaciones post traslacionales⁵⁴. Microtúbulos son estructuras dinámicamente inestables y oscilan entre fases de ensamblado y desensamblado⁵⁵. Aunque la desorganización del huso meiótico en células expuestas a bajas temperaturas ha sido ampliamente estudiada^{42,51,56,57}, poco se conoce sobre los cambios en el cito esqueleto de la célula espermática en tales condiciones. Como los microtúbulos del axonema son los microtúbulos más estables conocidos, se esperaba que no fueran afectados por la despolimerización del frío. Se describió un aumento en la detección de alfa tubulina en el semen criopreservado comparado con los controles frescos correspondientes²⁸. Además, en períodos más largos de semen criopreservado almacenado, más dramático es el aumento de detección de alfa tubulina.

DAÑO AL DNA:

Es conocido que la criopreservación es un procedimiento perjudicial para la célula que conlleva a cambios en la estructura del espermatozoide en la membrana mitocondrial y en el ADN^{58,59}. El mecanismo del daño celular es aún incierto, pero podría tener una etiología físico-química debido a las variaciones de temperatura así como estrés osmótico con la formación intracelular de cristales durante la criopreservación^{60,61}. Pero también el daño osmótico debido a la extensa contracción celular⁶². Por lo tanto el espermatozoide podría perder su función y algo de su potencial fertilidad. Esto fue en gran parte reportado en la congelación y descongelación resultando en una disminución de la motilidad y viabilidad del espermatozoide^{63,64}. El impacto de la criopreservación en el DNA fue también investigado por muchos estudios, pero los resultados permanecen controversiales. En algunos estudios la integridad del ADN del espermatozoide fue alterado después de la descongelación de una criopreservación^{64,65}, mientras que no fue afectado en otros estudios^{46,62}.

El estrés oxidativo fue estudiado como el posible mecanismo para el origen del daño en el DNA del espermatozoide. Fue extensamente reportado que especies reactivas al oxígeno son asociadas con una calidad de semen pobre y defectos funcionales en espermatozoides humanos^{66,67}. Se conoce que las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante en la fisiopatología del daño de espermatozoides humanos⁶⁸.

La fragmentación del DNA fue asociada con infertilidad masculina y con los defectos en los parámetros espermáticos^{66,69,71}, pero su origen aun no es claro.

Debido a que la criopreservación puede tener efectos deletéreos en la cromatina de los espermatozoides la evaluación de la integridad del DNA en la congelación y descongelación es de gran interés. Se ha hipotetizado que la criopreservación de espermatozoides induce significativo daño a la morfología de la cromatina espermática tanto en hombres fértiles como en infértiles⁵⁰. Muchas técnicas de evaluación de la integridad del DNA se vienen realizando para el uso de tratamientos de reproducción asistida y la consciente integridad del DNA espermático tiene un rol clave en la FIV⁷².

Después de la criopreservación, el semen anormal presenta niveles más altos de fragmentación del DNA que el semen normal^{71,73,74}. Zini et al observaron espermatozoides de pacientes con semen anormal en movilidad y morfología tienen aumento de los niveles de daño del DNA evaluados por prueba del TUNEL, después de seleccionarlos por swim up. Estas conclusiones podrían explicarse debido a la presencia de elevados porcentajes de espermatozoides inmaduros con varias anomalías incluyendo defectos del DNA en hombres con parámetros anormales del semen^{73,74}. Esto también fue reportado con hombres infértiles que tienen mas altos porcentajes de espermatozoides con fragmentación del DNA que el semen de hombres fértiles^{46,66,75}.

La oxidación del DNA biomarcado con 8 oxoguanina comunmente usado para evaluar las alteraciones de oxidación del DNA debido a su alta sensibilidad y especificidad asi como a su relativa abundancia en el DNA y potencial mutagenicidad⁷⁶. Este daño oxidativo del DNA es el resultado de la interacción entre DNA con los elementos reactivos al oxígeno en particular el radical hidroxilo. En presencia de oxígeno la guanosina es oxidada y transformada en 8 oxoguanina⁷⁷. La detección de oxidación de bases remanentes del DNA es la mejor evaluación del daño oxidativo en espermas⁷⁸ y esto se puede analizar por cromatografía líquida de alta definición (high-performance liquid chromatography, HPLC) y por un ensayo de OxyDNA⁷⁹.

En lo que concierne al daño por estrés oxidativo, no se muestra una diferencia significativa entre semen normal y anormal despues de la criopreservación⁷³; otros estudios en cambio mostraron niveles significativamente elevados de 8-hydroxy-20-deoxyguanosina (usando HPLC) en el DNA de la eyaculación de hombres infértiles que los hombres fértiles control^{70,75}.

En la literatura los resultados concernientes al daño celular inducido por la criopreservación son contradictorios. Se encontró que la criopreservación de espermas en hombres infértiles, inducía a un aumento en la peroxidación de lípidos que podría ser el resultado de la pérdida de la peroxidación en la actividad enzimática y el exceso de producción de elementos reactivos al oxígeno⁸⁰. En contraste algunos investigadores no encontraron un significativo aumento en la peroxidación de lípidos en espermas después de la criopreservación. Esta controversia puede ser explicado por el procedimiento de criopreservación usado, la eventual preparación del semen antes de ser criopreservado y los diferentes test de evaluación de la integridad del DNA usados entre unos y otros trabajos⁶⁹.

Se ha reportado que la fragmentación del DNA de espermas no fue afectado por la criopreservación en aquellos espermatozoides con alta motilidad seleccionados por gradiente de separación discontinua de Percoll⁴⁶. En contraste otros autores reportaron efectos deletereos en el DNA de espermas después de criopreservar una preparación de semen por procedimiento de swinn up, sin embargo la adición de plasma seminal al preparado de esperma, mejora la integridad del DNA despues de la criopreservación⁶⁴.

El daño al DNA del esperma se ha asociado a niveles elevados de elementos reactivos al oxígeno en semen fresco y posterior a la congelación/descongelación^{72,81}. En un reciente estudio⁸² suplementando un antioxidante (ascorbato y catalasa) reduce los niveles de elementos reactivos al oxígeno y el daño al DNA nuclear del esperma (evaluados por ensayo de cometa) y mejora en la calidad del proceso de congelación/descongelación en el esperma humano. Además se reportó que la adición de glutation (L-gamma-glutamyl-L-cisteinyglycine) en la descongelación el medio resultaba en una reducción de los elementos reactivos al oxígeno generados y en la fragmentación del DNA así como una mejora en la capacidad fertilizante de espermas de toros⁸³.

Se ha establecido que los elementos reactivos al oxígeno perturban el DNA nuclear y mitocondrial que incluyen la fragmentación, modificaciones de bases, deleciones y otras alteraciones⁸⁴. Normalmente el DNA del espermatozoide está envuelto por protaminas que lo protegen de la agresión de los elementos reactivos al oxígeno, sin embargo la deficiencia de protaminas en hombres infértiles, hace al DNA del espermatozoide vulnerable al ataque de los elementos reactivos al oxígeno⁸⁵.

INDICACIONES PARA LA CRIOPRESERVACION:

Desde la introducción de técnicas de congelación de semen humano las indicaciones para los criobancos de espermatozoides han sido ampliadas enormemente debido a los recientes grandes avances en la reproducción asistida, tanto para propio uso futuro así como banco de donante^{86,87}.

El progreso de las técnicas de reproducción asistida ha llevado al uso de semen criopreservado en casos de radioterapia, quimioterapia, algunas enfermedades malignas o incluso cirugías invasivas pueden inducir fallo testicular o disfunción eyaculatoria. Almacenado de espermatozoides de donantes, almacenado de espermatozoides recuperados de pacientes azoospermicos quienes han sido sometidos a extracciones testiculares de espermatozoides y aspiración espermática percutánea de epidídimo^{59,88}. El semen criopreservado es un método probado que solo se pueda ofrecer a parejas como alternativa para tener hijos después de algunas de estas condiciones.

En años recientes, el tratamiento del cáncer ha alcanzado un progreso importante en la reducción al mínimo de los efectos secundarios tanto a corto como a largo plazo. Los regímenes de tratamiento modificados permiten a los sobrevivientes de cáncer engendrar a niños después de la recuperación espontánea de su espermatogénesis⁸⁹. Los tratamientos que usan agentes alquilantes combinados con la irradiación de cuerpo total. Y el trasplante de médula ósea en la neoplasia hematológica, es en particular propenso para causar la esterilidad permanente como consecuencia de la pérdida de las células madres espermáticas⁹⁰. Por lo que la criopreservación de espermatozoides da la posibilidad tanto a hombres adultos y muchachos post puberales de criopreservar antes de la terapia para el cáncer.

Las indicaciones más frecuentes para criopreservación de espermatozoides incluyen:

1. Pacientes en edad reproductiva y sin hijos a los que se le ha diagnosticado un cáncer y que por ello van a recibir diferentes tratamientos, bien quirúrgicos o de quimioterapia o radioterapia, que pueden provocarles esterilidad transitoria o definitiva.
2. Pacientes sometidos a tratamientos farmacológicos con efecto teratogénico por ejemplo tratamientos con el interferón en la hepatitis C.
3. Pacientes sometidos a vasectomías, para garantizar sus posibilidades reproductivas en caso de que cambien de opinión.

4. Profesionales de riesgo, o pacientes que congelan semen como medida preventiva sin otro motivo (son los casos menos frecuentes).
5. Pacientes cuyas muestras son difíciles de obtener como ocurre con las biopsias testiculares, las muestras de semen lavadas por VIH o VHC, etc.
6. Pacientes con dificultades para el eyaculado debidas a impotencia, eyaculación retrógrada, malformaciones congénitas, etc.
7. Pacientes que por distintas razones es difícil que estén presentes en el momento en que se va a utilizar la muestra⁹¹.

RESULTADOS REPORTADOS EN LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN:

Cuando una muestra seminal es criopreservada, un gran número de espermatozoides aparecen fuertemente dañados y por tanto afuncionales¹². Existen estudios que demuestran además, que las células espermáticas que resisten estos procesos pueden ver su función afectada⁹². Se demostró que la criopreservación origina una reducción significativa en todos los parámetros de medición del semen. La movilidad espermática se redujo en un 50%, un porcentaje de supervivencia del 43%⁹³.

Se reportó datos que indican que un bajo mantenimiento de la velocidad espermática post descongelación está asociado con un significativo descenso en la fecundidad, apuntando la importancia de preservar este parámetro en el semen criopreservado¹⁰¹.

Estudiado la capacidad de fertilización del semen criopreservado utilizando el ensayo de penetración en el oocito del hámster. Algunos autores obtienen un bajo grado de penetración con semen congelado⁹⁵ mientras que otros autores no hallan diferencias estadísticas⁹⁶.

Se han publicado datos indicando que las tasas de penetración espermática de semen criopreservado eran mayores inmediatamente post descongelación y descendían a lo largo del tiempo. Mientras que el grado de penetración del semen fresco era menor inicialmente y aumentaba hasta el máximo 24 horas más tarde¹⁰². Esta investigación sugiere que las diferencias de penetración en el tiempo entre semen congelado y fresco pueden ser debidas a su estado acrosomal inicial y al tiempo necesario para la capacitación. Se puede deducir que los fenómenos que acontecen en torno a la criopreservación de semen van a alterar la fisiología de la célula espermática, desencadenando un estado de capacitación prematura que origina la reacción acrosómica de una forma acelerada, acortándose con ello la viabilidad celular y por lo tanto el poder fecundante de la célula, ya que tras sufrir la reacción acrosómica la vida del espermatozoide se encuentra muy limitada¹².

En una publicación de congelación espermática⁹⁴, tomando al azar 100 alícuotas de semen humano en pacientes entre 20 y 35 años descartaron las muestras con presencia de Oligozoospermia y astenozoospermia. Las muestras fueron expuestas al crioprotector TEST Yolk Buffer y congelados a -196°C dividiéndose los especímenes en dos grupos. El

primer grupo que permaneció almacenado y congelado por menos de 5 años y el segundo grupo congelado y almacenado por más de 5 años. Observaron que de las 50 muestras analizadas con más de cinco años de criopreservación 76% tuvieron más del 50% de movilidad. Mientras que en las siguientes 50, por debajo de cinco años de criopreservación, 80% tuvieron una movilidad mayor al 50%.

Una publicación²⁰ que comparó dos tipos de criopreservantes (test yema de huevo buffer Vs Sperm Crio) y dos técnicas de crio preservación (Vapor vs congelado computarizado) describió que el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva antes de su crio preservación disminuyó considerablemente en los cuatro grupos de técnicas después de la crio preservación de ($43.4 \pm 17.2\%$) a ($22.8 \pm 16.0\%$) en el grupo 1 test yema de huevo buffer y técnica de vapor, ($24.4 \pm 18.5\%$) grupo 2 test yema de huevo buffer y técnica automática, ($14.0 \pm 14.3\%$) grupo 3 Spermcryo y técnica de vapor. Y ($14.1 \pm 15.0\%$) grupo 4 Spermcryo y técnica automática. La vitalidad espermática también disminuyó en los cuatro grupos de $65 \pm 12\%$ a $35 \pm 17\%$ en el grupo 1; $38 \pm 17\%$ en grupo 2 y $27 \pm 16\%$ en los grupos 3 y 4. El porcentaje de espermatozoides que sobrevivieron a la criopreservación fue significativamente elevada en las muestra protegidas con test yema de huevo buffer que las con Spermcryo ($P < 0.001$). No se encontró diferencia significativa entre la técnica automática y técnica de vapor ($P = 0.35$).

Al comparar los efectos en el semen humano crio preservado en vapor y fase líquida de nitrógeno líquido⁶³. La movilidad progresiva antes del congelado fue de $39.87\% \pm 8.71\%$ y la morfología $11.08\% \pm 0.94\%$. Después de 3 días de almacenamiento en fase de vapor de nitrógeno líquido a -179°C se observó una disminución promedio en la movilidad progresiva a $16,87\% \pm 10,11\%$ representando una disminución del 48% respecto a la línea de base. Después del mismo periodo de tiempo de almacenamiento en fase líquida de nitrógeno líquido a -196°C se observó una disminución promedio en la movilidad progresiva a $19.39\% \pm 12.24\%$, con una disminución en la motilidad progresiva respecto a la línea de base del 42%. El promedio de los porcentajes de morfología espermática normal en ambos vapor y fase líquida no tenían diferencias significativas ($6.05\% \pm 0.80\%$ vs. $6.16\% \pm 0.95\%$, $P=.43$).

Entre 1995 y el 2005 80 jóvenes entre 13,7 y 18,9 años (media de 16,6 años) se valoraron para criopreservación de semen antes de un tratamiento potencialmente gonadotóxico⁹⁷. Trece muchachos fueron incapaces de proporcionar la muestra seminal por masturbación. En 53 la calidad de semen era adecuado para criopreservación. En 14 el análisis de semen no mostró espermatozoides móviles, y por lo tanto el semen no podía ser criopreservado y se midieron los niveles hormonales de FSH, LH e inhibina B. La conclusión fue que el semen criopreservado en muchachos es un método factible para conservar espermatozoides antes de la terapia gonadotóxica y se debería ofrecer a todos los muchachos púberes a pesar de su edad.

Al evaluar la capacidad de dos métodos de criopreservación⁹⁸ (Irvine Scientific method Vs Cleveland Clinic Foundation method) y tres criotectores (Tris yolk buffer, Sperm Freezing

Medium y Enhance Sperm Freeze) para conservar la calidad de espermatozoides de veinte hombres sub fértiles y diez donantes sanos. Los porcentajes de motilidad espermática del post descongelado y criosobrevivencia eran más altos en el Irvine Scientific method comparado con el método Cleveland Clinic Foundation. Sin embargo, el método Cleveland Clinic Foundation mostró mejores cinéticas en los espermatozoides. La motilidad de post descongelado en los donantes y pacientes sub fértiles era la más alta en las muestras congeladas en Tris yolk buffer que con los otros criopreservantes.

TECNICA DE CRIOPRESERVACION USADA ACTUALMENTE EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES:

Debido al gran impacto de la criopreservación de semen y su utilización en las diferentes técnicas de reproducción asistida en la reproducción animal y humana, constantemente se modifican los protocolos y técnicas de congelación a fin de obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y capacidad fecundante del semen al descongelarlo.

En nuestro instituto se utiliza la técnica FREEZING TEST YOLK BUFFER (TYB)/GLYCEROL NITROGENO LIQUIDO.

REACTIVOS:

TEST, TRIS, Citrato de sodio y fructuosa. Penicilina 1.000 U/ml. Sulfato de estreptomycin 1.000 mcg/ml. Glicerol 12% (v/v). Heat inactivated egg yolk obtained from specific pathogen (SPF) laying flocks sterile filtered.

MATERIAL:

1. Recipiente colectores estériles.
2. Tubos cónicos de 15 ml.
3. Pipetas de transferencia de 7 ml estériles.
4. Pipeta automática de 10 a 100 ul.
5. Puntas estériles para pipetas automáticas.
6. Porta objetos de 26x76 mm.
7. Cubre objetos de 22x22 mm.
8. Cámara de New Bauer.
9. Gradilla ahulada.
10. Crioviales de 2 ml.
11. Jeringas de 5 ml.

EQUIPO:

1. Microscopio de contraste de fases.
2. Contador de células.

3. Cellevator o Refrigerador/congelador.
4. Tanque de nitrógeno.

PROCEDIMIENTO DE CONGELACION MANUAL:

1. Esperar la licuefacción de la muestra del semen.
2. En condiciones de esterilidad pasa la muestra a tubos cónicos.
3. Valorar 10 uL de la muestra: Características fisicoquímicas y microscópicas.
4. Agregar lentamente y homogenizando a intervalos el TEST/Yolk volumen a volumen estando a 4°C.
5. Fraccionar la muestra en crioviales colocando aproximadamente 1.5 ml a cada uno.
6. Rotular cada vial con su respectivo código (iniciales de nombre y apellido así como fecha de congelación).
7. Esperar 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Pasar los viales 15 minutos al refrigerador (4°C).
9. Pasar los viales 15 minutos al congelador (-12°C).
10. Pasar los viales 15 minutos a vapores del nitrógeno líquido.
11. Sumergir los crioviales al nitrógeno líquido en su caña correspondiente que contengan las mismas iniciales que los crioviales mencionados en la bitacora de la posición que ocupa dentro del tanque-

PROCEDIMIENTO DE DESCONGELACION:

1. Sacar el criovial y colocarlo en baño María (37°C) por 10 minutos para que descongelado rápido.
2. Pasar el contenido a un tubo cónico, agregar 2 ml de albúmina humana al 5% en HTF modified.
3. Resuspender y centrifugar a 1200 revoluciones/ 8 minutos-
4. Eliminar el sobre nadante, el paquete celular resuspenderlo en 0.5 ml en albumina humana 5%.
5. Valorar 10 ul de la muestra.
6. El TCM (total de células móviles debe ser $> 20 \times 10^6$ espermatozoides).
7. Llenar el reporte de recuperación de semen.

NUMERO DE ESPERMATOZOIDES REQUERIDOS PARA TECNICAS DE REPRODUCCION ASISTIDA:

Para poder interactuar adecuadamente con el oocito, los espermatozoides deben estar vivos, móviles y poseer la membrana plasmática y acrosomal intactas y funcionales. Pérdidas celulares durante la criopreservación, pueden compensarse en parte mediante la inseminación artificial de un gran número de espermatozoides, o bien mediante el depósito del semen en la porción más alta posible del tracto reproductivo²⁴. La competencia numérica y temporal de estos espermatozoides depende tanto del número como de la calidad de espermatozoides introducidos en el tracto genital distal. Cuando la

calidad o el número de espermatozoides inseminados no son óptimos, la disponibilidad de espermatozoides potencialmente fértiles es escasa y la fertilidad se ve reducida. Si el número total de espermatozoides funcionales en una inseminación artificial con semen congelado cae por debajo del número necesario para lograr una alta probabilidad de fertilización, entonces la fertilidad se ve afectada. Cuando la inseminación artificial es realizada en la región proximal del tracto genital se requieren pocos espermatozoides para lograr altas probabilidades de fertilidad ya que muchos sobrevivirán para alcanzar el oviducto. Se demostró que solo 20×10^6 espermatozoides móviles crio preservados son necesarios para lograr un porcentaje de fertilidad mayor al 50% realizando inseminación intrauterina en ovejas mientras que se necesita una dosis muy superior al utilizar la inseminación artificial cervical¹⁰⁴. Si la inseminación artificial fue hecha dentro del oviducto se requieren menos de 1×10^6 espermatozoides¹⁰⁵.

La inseminación artificial es eficaz como tratamiento del factor masculino cuando la movilidad inicial de los espermatozoides es mayor o igual al 30% y el total de espermatozoides móviles es mayor o igual al 5×10^6 . Si los valores iniciales son menores, el porcentaje de éxito disminuye¹⁰³. Algunos autores intentaron definir el límite inferior en la concentración de espermatozoides por mililitro así como el número total de espermatozoides móviles en muestras para inseminación. Se ha reportado bajos porcentajes de embarazos si la muestra contenía menos de 10 millones de espermatozoides en total¹⁰⁶. En lo que concierne al límite inferior para inseminación existen rangos que van desde 3 millones de espermatozoides móviles¹⁰⁷ a 5 millones¹⁰⁸ e inclusive 10 millones de espermatozoides móviles^{106,109}.

Para los programas de fertilización *in vitro* (FIV) el seminograma de la muestra capacitada debe cumplir los siguientes requisitos: una movilidad A+B de 68%, una concentración espermática igual o superior a 10^6 espermatozoides/mL y un 3% de formas normales¹¹². En caso de no cumplir estos requisitos la muestra seminal será candidata a técnica de ICSI.

La determinación del número de células requeridas para la utilización en técnicas de reproducción asistida es un tema de continuo estudio y debate. Dependerá de cada protocolo institucional y las características específicas de cada muestra en el caso de pacientes con alteraciones evidentes en sus parámetros seminales.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

OBJETIVO:

Comparar los parámetros seminales de concentración, movilidad progresiva, morfología normal y total de células móviles de muestras sometidas a congelación mediante la técnica freezing test yolk buffer (TYB)/glicerol nitrógeno líquido -196°C en muestras con diferente calidad obtenidas de pacientes infértiles y de varones con fertilidad comprobada

DISEÑO:

Estudio descriptivo, experimental, prospectivo, analítico

UNIVERSO, LUGAR Y DURACIÓN:

Se recolectaron 8 muestras de varones sanos sin problemas de infertilidad, con paternidad comprobada y 7 muestras de pacientes con factor masculino de infertilidad que acuden al laboratorio de andrología del instituto nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes de mayo de 2009 a octubre de 2009.

CRITERIOS DE INCLUSION:

Se incluyeron al grupo de varones sanos sin problema de infertilidad con las siguientes características:

1. Edad entre 18 y 38 años.
2. No padecer ni tener antecedentes heredofamiliares directos de trastornos genéticos mayores.
3. No tener datos clínicos de infección seminal.
4. Paternidad comprobada que acompañen a sus parejas participando activa y responsablemente en el proceso de las valoraciones prenatales en nuestro instituto.
5. No haber logrado el embarazo actual a través de tratamiento de reproducción asistida.

Se incluyeron al grupo de pacientes con factor masculino de infertilidad a varones con las siguientes características:

1. Edad entre 18 y 38 años.
2. Encontrarse en tratamiento y seguimiento de infertilidad por factor masculino en el servicio de andrología del instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

3. Estar clasificados en el servicio de andrología como oligo, asteno o teratozoospermia como factor masculino de infertilidad.
4. Haberse descartado infección seminal en el pre congelado de la muestra.
5. Haber realizado tratamiento previo de infección seminal y haberse corroborado el éxito del tratamiento por microbiología a través de cultivo seminal.

VARIABLES EN ESTUDIO:

VARIABLES dependientes. Densidad espermática, movilidad progresiva, morfología normal, total de células móviles.

VARIABLE independiente. Congelación espermática.

METODOLOGIA:

Se incluyeron en el estudio 8 muestras de semen de varones sanos con fertilidad comprobada y 7 muestras de pacientes del servicio de andrología con factor masculino de infertilidad que cumplieran con los criterios de inclusión.

Ambos grupos de estudio colectaron la muestra mediante masturbación siguiendo los criterios de la OMS para recolección/evaluación de la muestra de semen. Las muestras coleccionadas se dejaron a temperatura ambiente por espacio de 15 a 30 minutos para su licuefacción. Se realizó espermatobioscopía directa con evaluación de la morfología con los criterios estrictos de Kruger. Posteriormente realizamos criopreservación mediante técnica de de TEST de York/glicerol nitrógeno líquido -196°C , agregamos lentamente y homogenizando a intervalos el TEST/Yolk volumen a volumen a 4°C . Fraccionamos la muestra en crioviales colocando aproximadamente 1.5 ml a cada uno. Rotulamos cada vial con sus respectivos códigos. Esperamos 10 minutos a temperatura ambiente. Pasamos los viales por 15 minutos al refrigerador (4°C), 15 minutos al congelador (-12°C), 15 minutos a vapores del nitrógeno líquido y sumergimos los crioviales al nitrógeno líquido en su caña correspondiente. Las muestras permanecieron congeladas en nitrógeno líquido a -196°C , por un espacio de 30 días y posterior descongelamiento mediante técnica de descongelamiento rápido. Sacar el criovial y colocarlo en baño María (37°C) por 10 minutos para que descongelado rápido. Pasamos la muestra del criovial a un tubo cónico, agregamos 2 ml de albúmina humana al 5% en HTF modified. Resuspendimos y centrifugamos a 1200 revoluciones/ 8 minutos. Eliminamos el sobre nadante, el paquete celular fué resuspendido en 0.5 ml en albumina humana 5%. Valoramos 10 ul de la muestra parámetros de densidad espermática, movilidad, viabilidad y morfología.

CAPITULO IV

RESULTADOS:

PRECONGELACION VARONES SANOS CON PATERNIDAD COMPROBADA: El promedio del volumen espermático pre congelación de los varones sano con paternidad comprobada fue de 1.6 ml con un rango entre 0.8 y 3 ml (D.S. ± 0.62). El promedio de la densidad espermática fue de 141.12 millones de espermatozoides por mililitro con un rango entre 41 y 300 millones de espermatozoide por mililitro (D.S. ± 89.09). El promedio de la movilidad progresiva rápida tipo A fue de 1.12 % con un rango entre 0 y 9% (D.S. ± 2.97). El promedio de la movilidad progresiva lenta tipo B fue de 62.87 % con un rango entre 43 y 80% (D.S. ± 11.93). El promedio de la movilidad A+B fue de 64% con un rango entre 43 y 80% (D.S. ± 13.01). El promedio del total de células móviles (TCM) fue de 124.24 con un rango entre 29.02 y 235.2 (D.S. ± 71.10). El promedio de la viabilidad fue del 85.7% con un rango entre 77 y 94% (D.S. ± 85.75). El promedio de la morfología fue de 9.5% con un rango entre 5 y 15% (D.S. ± 3.57). Tabla 1.

POSTDESCONGELACION VARONES SANOS CON PATERNIDAD COMPROBADA: El promedio de la densidad espermática post descongelación fue de 151.12 millones de espermatozoides por mililitro con un rango entre 60 y 260 millones de espermatozoide por mililitro (D.S. ± 80.47). El promedio de la movilidad progresiva rápida tipo A fue de 10.87 % con un rango entre 0 y 29% (D.S. ± 12.06). El promedio de la movilidad progresiva lenta tipo B fue de 33.5 % con un rango entre 2 y 66% (D.S. ± 21.05). El promedio de la movilidad A+B fue de 44.37% con un rango entre 4 y 66% (D.S. ± 21.07). El promedio de la viabilidad fue del 59.25% con un rango entre 40 y 76% (D.S. ± 10.19). El promedio de la morfología fue de 7.12% con un rango entre 3 y 11% (D.S. ± 2.66). Tabla 2.

Las diferencias de los parámetros seminales entre pre y post congelación de varones sanos con paternidad comprobada, se muestran en la tabla 3, 4 y 5. Encontramos en promedio un 63.54% de pérdida en el total de células móviles (TCM) al momento de descongelar las muestras y una recuperación espermática del TCM promedio de 36.45% de espermatozoides. Encontramos que en promedio se perdió el 2.37% de las formas normales de espermatozoides posterior al descongelado. Y un 18.33% de cambios en la morfología espermática tras el descongelados de esas muestras. Además se perdió el 30.5% de espermatozoides con movilidad A+B después del congelado, observando cambios en la movilidad A+B en un 48% de las formas móviles en el descongelado.

La correlación entre el porcentaje de espermatozoides recuperados con el total de células móviles previa a la congelación nos grafica que a mayor total de células móviles en la muestra seminal del varón sano con fertilidad comprobada mayor será el porcentaje de recuperación espermática en el descongelado de esas muestras, gráfica 1.

La correlación entre el porcentaje de pérdidas de espermatozoides con el total de células móviles (TCM) antes del congelado nos muestra que a menor total de células móviles

antes del congelado mayor será el porcentaje de pérdidas de espermatozoides después del congelado.

PRECONGELACION PACIENTES CON FACTOR MASCULINO DE INFERTILIDAD: El promedio de la densidad espermática antes de la congelación de los pacientes con factor masculino de infertilidad fue de 56.85 millones de espermatozoides por mililitro con un rango entre 23 y 160 millones de espermatozoide por mililitro (D.S. ± 47.60). El promedio de la movilidad progresiva rápida tipo A fue de 1.14 % con un rango entre 0 y 5% (D.S. ± 3.88). El promedio de la movilidad progresiva lenta tipo B fue de 49% con un rango entre 30 y 73% (D.S. ± 27.52). El promedio de la movilidad A+B fue de 50.14% con un rango entre 30 y 77% (D.S. ± 28.60). El promedio del total de células móviles (TCM) fue de 66.37 con un rango entre 27.6 y 194.04 (D.S. ± 62.48). El promedio de la viabilidad fue del 42% con un rango entre 0 y 84% (D.S. ± 37.46). El promedio de la morfología fue de 5.57% con un rango entre 1 y 8% (D.S. ± 3.95). Tabla 6.

POSTDESCONGELACION PACIENTES CON FACTOR MASCULINO DE INFERTILIDAD: El promedio de la densidad espermática posterior a la descongelación fue de 43.14 millones de espermatozoides por mililitro con un rango entre 0 y 120 millones de espermatozoides por mililitro (D.S. ± 39.81). El promedio de la movilidad progresiva rápida tipo A fue de 0.57% con un rango entre 0 y 3% (D.S. ± 3.83). El promedio de la movilidad progresiva lenta tipo B fue de 18.14% con un rango entre 0 y 61% (D.S. ± 21.95). El promedio de la movilidad A+B fue de 18.71% con un rango entre 0 y 61% (D.S. ± 21.79). El promedio de la viabilidad fue del 35.57% con un rango entre 0 y 76% (D.S. ± 23.28). El promedio de la morfología fue de 4% con un rango entre 0 y 8% (D.S. ± 4.29). Tabla 7.

Las diferencias de los parámetros seminales entre pre y post congelación de pacientes con factor masculino de infertilidad, se muestran en la tabla 8, 9,10 y 11. Encontramos en promedio una pérdida del 71.15% del total de células móviles (TCM) al momento de descongelar y una recuperación espermática del TCM en promedio del 28.84%. La densidad espermática en el descongelado también se vio afectada ya que solo el 13.71% de la densidad espermática antes del congelado se recuperó en el descongelado. Los cambios en la morfología espermática tras el descongelados muestran que en promedio se recupero el 1.57% de formas normales y el porcentaje de cambios en las formas normales del semen descongelado fue de 32.14%. Además se perdió en promedio el 31.42% de espermatozoides con movilidad A+B, observamos cambios en la movilidad A+B en un 20.34% de las formas móviles del semen descongelado.

En las muestras seminales de pacientes con factor masculino de infertilidad la correlación entre el porcentaje de espermatozoides recuperados con el total de células móviles precongeladas nos grafica que a menor total de células móviles menor será el porcentaje de recuperación espermática en el descongelado de esas muestras, gráfica 3.

En cuanto a la correlación entre el porcentaje de pérdidas de espermatozoides con el total de células móviles (TCM) antes del congelado nos muestra que a menor total de

células móviles antes del congelado mayor será el porcentaje de pérdidas de espermatozoides después del congelado.

CAPITULO V

DISCUSIÓN:

Cuando Spallanzani en 1776 reportó por primera vez el mantenimiento de la movilidad del espermatozoide humano después de su exposición a bajas temperaturas dio lugar al nacimiento de una nueva rama de la biotecnología, la criotecnología. Los últimos 50 años fueron importantes para el conocimiento de los fenómenos fisicoquímicos, moleculares y del metabolismo que el espermatozoide experimenta cuando se expone a muy bajas temperaturas. Sin lugar a duda el más importante avance en la criopreservación de espermatozoides fue el descubrimiento y su sistemática aplicación de los agentes crioprotectores para disminuir el daño en la célula que va ser criopreservada. Gracias a estos avances en las técnicas de criopreservación se ha mejorado importantemente la recuperación de espermatozoides convirtiéndose en una importante herramienta en las diferentes técnicas de reproducción asistida. Lamentablemente los resultados aun que mejorados, todavía permanecen como un reto para la criotecnología. Es probable que estos resultados puedan ser mejorados en el tiempo una vez que aprendamos más sobre los detalles aun desconocidos de los fenómenos que provocan los cambios en la estructural, función y metabolismo del espermatozoide que va ha ser sometido a criopreservación.

Por el momento el uso de espermatozoides criopreservados para técnicas de reproducción asistida se basa en la identificación de poblaciones espermáticas descongeladas intactas o con daños sub letales pero que mantengan funciones celulares poco alteradas para evitar la ocurrencia de potenciales errores genéticos o fallas en los tratamientos de reproducción asistida que influiría negativamente no solo en estado psicológico-emocional sino también en la economía de los hombres y parejas infértiles.

A pesar de los esfuerzos para obtener mejores resultados en el descongelado de muestras seminales se siguen obteniendo muestras con disminución de la movilidad a diferencia de las que se obtienen con semen fresco¹¹⁰. Aun que muchos autores reportan tasas del 50% de sobrevivencia y recuperación de la mayoría de los parámetros seminales^{11,12,20,24,111} sin riesgos apreciables de daño espermático. Es de esperar que la mayoría de las muestras de semen de hombres sanos tengan una reducción en la densidad, movilidad y morfología durante el proceso de criopreservación. Nosotros encontramos en promedio un 63.54% de pérdida en el total de células móviles (TCM) al momento de descongelar las muestras y una recuperación espermática en el TCM promedio de 36.45% de espermatozoides. En promedio se perdió el 2.37% de las formas normales de espermatozoides posterior al descongelado. Y un 18.33% de cambios en la morfología espermática tras el descongelados de las muestras de varones sanos con fertilidad comprobada. Por otro lado, otros autores tienen resultados variables en cuanto a la recuperación espermática de semen criopreservado. Punyatanasakchai y colaboradores en un estudio que comparó el porcentaje de recuperación de espermatozoides sometidos a criopreservación en nitrógeno líquido y vapor de nitrógeno líquido tras 3 días de almacenamiento a temperaturas de -196°C (nitrógeno líquido) y

-179°C (vapor de nitrógeno líquido) donde evidenció un promedio de pérdida en la movilidad progresiva y morfología espermática del 48% en vapor de nitrógeno y 42% en nitrógeno líquido al descongelar muestras de donadores, estas diferencias entre ambas técnicas no fue estadísticamente significativa⁶³. La diferencia con nuestros hallazgos podría deberse a la técnica y al tiempo de criopreservación, pues se ha demostrado que a mayor tiempo de almacenamiento, menores son las tasas de recuperación espermática mas sin embargo esto último también tiene resultados contradictorios. La temperatura de almacenamiento tendría un papel importante al momento de recuperar espermatozoides en el descongelado. Trummer y colaboradores al congelar muestras de varones sanos sin problemas de infertilidad con técnica TEST yolk/buffer por 7 días a -70°C y a -196°C encontraron pérdida de la movilidad y morfología de semen del 47% a -70°C y del 39% cuando se almacenaba a -196°C. Cuando los mismos autores descongelaban muestras luego de 30 días de almacenamiento encontraron una disminución en la movilidad y morfología del 72% cuando se almacenaba a -70°C y 39% cuando se almacenaba a -196°C¹¹³.

Es evidente que no todos los individuos poseen espermatozoides que puedan ser criopreservados eficazmente. Nosotros observamos que las muestras de semen de hombres con factor masculino de infertilidad las tasas de recuperación espermática posterior a la congelación fueron bajas. Llama la atención que en una muestra luego de la criopreservación se perdió el total de la muestra evidenciándose una viabilidad y sobrevivida del 0%. En promedio, la densidad espermática en el descongelado se vio afectada puesto que solo el 13.71% de la densidad espermática antes del congelado se recuperó en el descongelado. En promedio se perdió el 71.15% del total de células móviles al momento de descongelar y una recuperación espermática del total de células móviles en promedio del 28.84%. Los cambios en la morfología espermática tras el descongelado también eran bajas en promedio se recupero el 1.57% de formas normales en y el porcentaje de cambios en las formas normales del semen descongelado fue de 32.14%.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES:

Las criopreservación es una herramienta útil para su uso en las técnicas de reproducción asistida para ampliar las perspectivas reproductivas de los hombres y parejas infértiles.

El total de células móviles en las muestras que van a ser sometido a criopreservación sería uno de los parámetros más importantes para correlacionar los porcentajes de recuperación espermática en el descongelado.

Los porcentajes de recuperación tras el descongelado con técnica TEST Yolk/glicerol en el laboratorio del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes son bajos, se perderá un total de células móviles del 63.54% y solo un 36.46% del total de células móviles serán recuperados en el descongelado de muestras de varones sanos con paternidad comprobada. En muestras de varones infértiles las tasas de pérdidas son mayores, en promedio se perdió el 71.15% del total de células móviles al momento de descongelar y una recuperación espermática del total de células móviles en promedio del 28.84%. Los resultados nos muestran que el daño letal y sub letal a los espermatozoides que va ser criopreservados son más claros en los hombres infértiles que en los fértiles.

Si bien los hallazgos del presente estudio son preliminares, es evidente resaltar la importancia de contar con una población de estudio mayor para tener conclusiones lo más acercadas a la realidad de los cambios espermáticos en la criopreservación.

TABLAS

TABLA 1. PARAMETROS SEMINALES EN LA ESPERMATOBIOSCOPIA DE VARONES SANOS CON PATERNIDAD COMPROBADA ANTES DEL CONGELADO.

	PRE CONGELADO							
	VOLUMEN	DENSIDAD	MOVILIDAD A	MOVILIDAD B	MOVILIDAD A+B	TCM	VIABILIDAD	MORFOLOGIA
	1.5	180	0	78	78	210.6	94	15
	2	55	0	59	59	64.9	86	6
	0.8	300	0	80	80	192	86	15
	1.5	41	0	54	54	33.21	77	8
	1	200	0	63	63	126	83	8
	1.5	210	0	55	55	173.25	84	5
	1.5	45	0	43	43	29.025	85	11
	3	98	9	71	80	235.2	91	8
PROMEDIO	1.6	141.12	1.12	62.87	64	124.24	85.75	9.5
D.S.	0.62	89.09	2.97	11.93	13.01	76.66	4.78	3.57

TABLA 2. PARAMETROS SEMINALES EN LA ESPERMATOBIOSCOPIA DE VARONES SANOS CON PATERNIDAD COMPROBADA DESPUES DEL CONGELADO.

POST CONGELADO							
ESTADIGRAFOS	DENSIDAD	MOVILIDAD A	MOVILIDAD B	MOVILIDAD A+B	TCM	VIABILIDAD	MORFOLOGIA
	260	29	29	58	75.4	60	10
	89	20	23	43	19.135	52	4
	260	29	29	58	75.4	60	3
	60	4	12	16	4.8	56	8
	200	0	60	60	120	70	8
	190	0	66	66	62.7	76	5
	60	2	2	4	1.2	40	11
	90	3	47	50	45	60	8
PROMEDIO	151.12	10.87	33.5	44.37	50.45	59.25	7.12
D.S.	80.47	12.06	21.05	21.07	36.13	10.19	2.66

TABLA 3. DIFERENCIA ENTRE EL TOTAL DE CELULAS MOVILES (TCM) ANTES Y DESPUES DEL CONGELADO, PORCENTAJES DE PÉRDIDAS Y PORCENTAJES DE RECUPERACION DE ESPERMATOZOIDES EN VARONES SANOS CON FERTILIDAD COMPROBADA DESPUES DEL CONGELADO.

ESTADIGRAFO	TCM PRE	TCM POST	DIFERENCIA TCM PRE – TCM POST	PORCENTAJE DE PERDIDA	PORCENTAJE DE RECUPERACION
	140.4	75.4	65	46.29	53.70
	64.9	19.13	45.76	70.51	29.48
	192	75.4	116.6	60.72	39.27
	33.21	4.8	28.41	85.54	14.45
	126	120	6	4.76	95.23
	173.25	62.7	110.55	63.80	36.19
	29.02	1.2	27.82	95.86	4.13
	235.2	45	190.2	80.86	19.13
PROMEDIO	124.24	50.45	73.79	63.54	36.45

TABLA 4. DIFERENCIA ENTRE EL PORCENTAJE DE FORMAS NORMALES ANTES Y DESPUES DEL CONGELADO Y EL PORCENTAJE DE CAMBIOS EN LA MORFOLOGIA DE LAS MUESTRAS SEMINALES DE VARONES SANOS CON FERTILIDAD COMPROBADA.

ESTADIGRAFO	MORFO PRE	MORFO POST	MORFO PRE- MORFO POST	% CAMBIOS MORFOLOGIA
	15	10	5	33.33
	6	4	2	33.33
	15	3	12	80
	8	8	0	0
	8	8	0	0
	5	5	0	0
	11	11	0	0
	8	8	0	0
PROMEDIO	9.5	7.12	2.37	18.33

TABLA 5. DIFERENCIA ENTRE EL PORCENTAJE DE MOVILIDAD A+B ANTES Y DESPUES DEL CONGELADO Y EL PORCENTAJE DE CAMBIOS EN LA MOVILIDAD A+B DE LAS MUESTRAS SEMINALES DE VARONES SANOS CON FERTILIDAD COMPROBADA.

ESTADIGRAFO	MOV A+B PRE	MOV A+B POST	MOVA+BPRE- MOVA+BPOST	% CAMBIOS MOV A+B
	78	29	49	62.82
	59	23	36	61.01
	80	29	51	63.75
	54	12	42	77.77
	63	60	3	4.76
	55	66	-11	-20
	43	2	41	95.34
	80	47	33	41.25
PROMEDIO	64	33.5	30.5	48.34

TABLA 6. PARAMETROS SEMINALES EN LA ESPERMATOBIOSCOPIA DE PACIENTES CON FACTOR MASCULINO DE INFERTILIDAD ANTES DEL CONGELADO.

ESTADIGRAFO	PRE CONGELADO							
	VOLUMEN	DENSIDAD	MOVILIDAD A	MOVILIDAD B	MOVILIDAD A+B	TCM	VIABILIDAD	MORFOLOGIA
	2	30	1	52	53	31.8	80	5
	1.5	53	0	73	73	58.035	22	7
	3.5	39	2	72	74	101.01	0	1
	0.8	160	0	39	39	49.92	70	3
	4	63	5	72	77	194.04	0	8
	4	23	0	30	30	27.6	80	3
	1.5	30	0	55	55	173.25	84	5
PROMEDIO	2.47	56.85	1.14	49	50.14	66.37	42	5.57
D.S.	3.25	47.60	3.88	27.52	28.60	62.48	37.46	3.95

TABLA 7. PARAMETROS SEMINALES EN LA ESPERMATOBIOSCOPIA DE PACIENTES CON FACTOR MASCULINO DE INFERTILIDAD DESPUES DEL CONGELADO.

ESTADIGRAFO	POST CONGELADO							
	VOLUMEN	DENSIDAD	MOVILIDAD A	MOVILIDAD B	MOVILIDAD A+B	TCM	VIABILIDAD	MORFOLOGIA
	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	0	0	61	61	0	76	7
	0.5	50	0	0	0	0	22	0
	0.5	60	1	1	2	0.6	40	0
	0.5	120	0	12	12	7.2	30	6
	1	28	0	40	40	11.2	47	7
	0.5	44	3	13	16	3.52	34	8
PROMEDIO	0.5	43.14	0.57	18.14	18.71	3.21	35.57	4
D.S.	3.72	39.81	3.83	21.95	21.79	4.93	23.28	4.29

TABLA 8: DIFERENCIA ENTRE EL TOTAL DE CELULAS MOVILES (TCM) ANTES Y DESPUES DEL CONGELADO, PORCENTAJES DE PÉRDIDAS Y PORCENTAJES DE RECUPERACION DE ESPERMATOZOIDES EN PACIENTES CON FACTOR MASCULINO DE INFERTILIDAD DESPUES DEL CONGELADO.

ESTADIGRAFO	TCM PRE	TCM POST	TCM PRE-TCM POST	% DE PERDIDA	% RECUPERACION
	31.8	0	31.8	100	0
	58.03	0	58.03	100	0
	101.01	0	101.01	100	0
	49.92	0.6	49.32	98.79	1.20
	194.04	7.2	186.84	96.28	3.71
	27.6	11.2	16.4	59.42	40.57
	2.25	3.52	-1.27	-56.44	156.44
PROMEDIO	66.37	3.21	63.16	71.15	28.84

TABLA 9. DIFERENCIA ENTRE LA DENSIDAD ANTES DEL CONGELADO Y DESPUES DEL DESCONGELADO Y EL % DE LOS CAMBIOS DE LA DENSIDAD DE LAS MUESTRAS SEMINALES DE PACIENTES CON FACTOR MASCULINO DE INFERTILIDAD.

ESTADIGRAFO	DENSIDAD PRE	DENSIDAD POST	DEN PRE-DEN PRO	% CAMBIOS DENSIDAD
	30	0	30	100
	53	0	53	100
	39	50	-11	-28.20
	160	60	100	62.5
	63	120	-57	-90.47
	23	28	-5	-21.73
	30	44	-14	-46.66
PROMEDIO	56.85	43.14	13.71	10.77

TABLA 10. DIFERENCIA ENTRE EL PORCENTAJE DE FORMAS NORMALES ANTES DEL CONGELADO Y DESPUES DEL DESCONGELADO Y EL % DE LOS CAMBIOS EN LA MORFOLOGIA NORMAL DE LAS MUESTRAS SEMINALES DE PACIENTES CON FACTOR MASCULINO DE INFERTILIDAD.

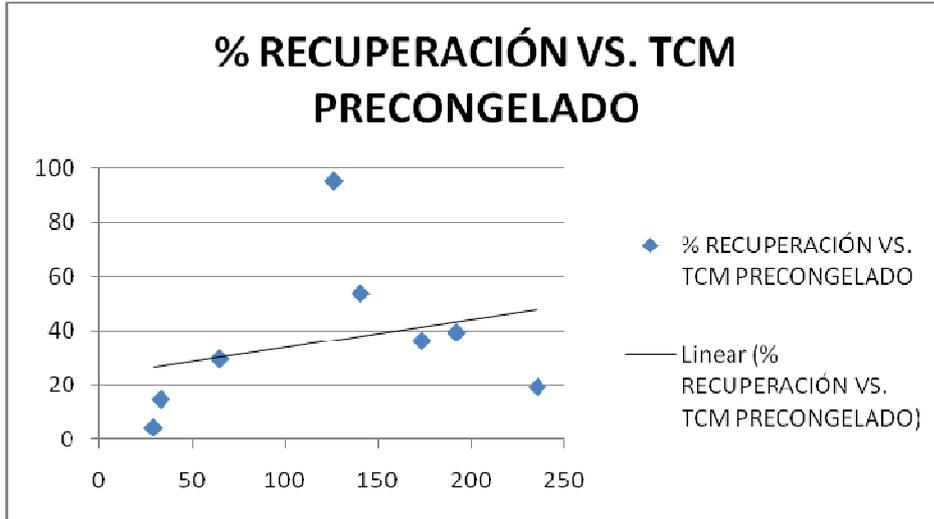
ESTADIGRAFO	MORFO PRE	MORFO POST	MORFO PRE-MORFO POST	% CAMBIOS MORFOLOGIA
	5	0	5	100
	7	7	0	0
	1	0	1	100
	3	0	3	100
	8	6	2	25
	3	7	-4	-133.33
	12	8	4	33.33
PROMEDIO	5.57	4	1.57	32.14

TABLA 11. DIFERENCIA ENTRE EL PORCENTAJE DE MOVILIDAD A+B ANTES DEL CONGELADO Y DESPUES DEL DESCONGELADO Y EL % DE LOS CAMBIOS EN LA MOVILIDAD A+B DE LAS MUESTRAS SEMINALES DE PACIENTES CON FACTOR MASCULINO DE INFERTILIDAD.

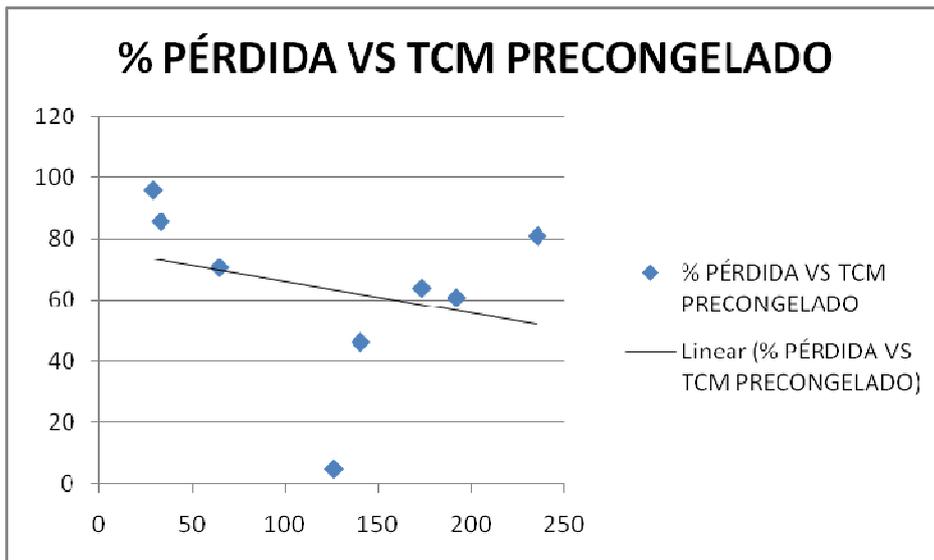
ESTADIGRAFO	MOV A+B PRE	MOV A+B POST	MOVA+BPRE- MOVA+BPOST	% CAMBIOS MOV A+B
	53	0	53	100
	73	61	12	16.43
	74	0	74	100
	39	2	37	94.87
	77	12	65	84.41
	30	40	-10	-33.33
	5	16	-11	-220
PROMEDIO	50.14	18.71	31.42	20.34

GRÁFICAS

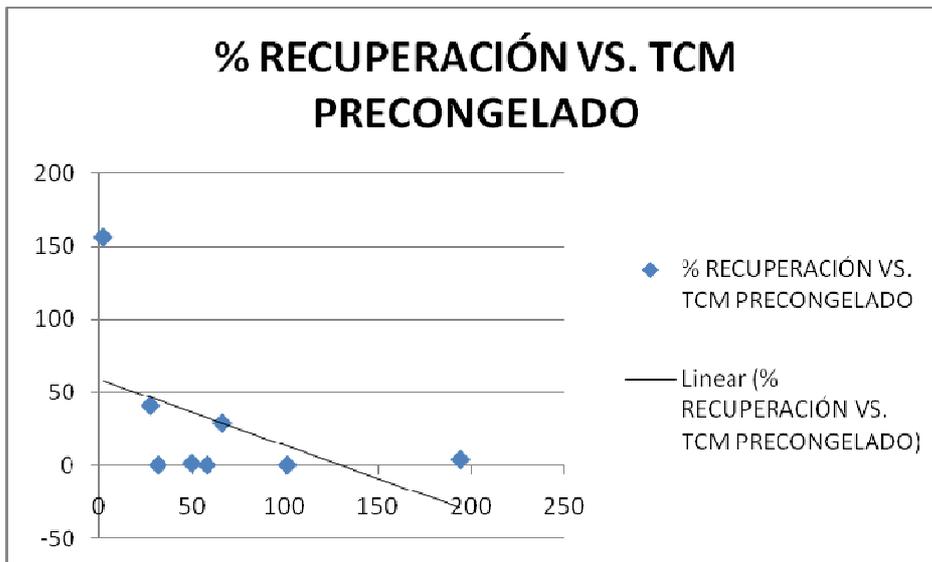
GRAFICA 1. CORRELACIÓN ENTRE EL PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS DE VARONES SANOS CON FERTILIDAD COMPROBADA CON EL TOTAL DE CÉLULAS MÓVILES ANTES DEL CONGELADO



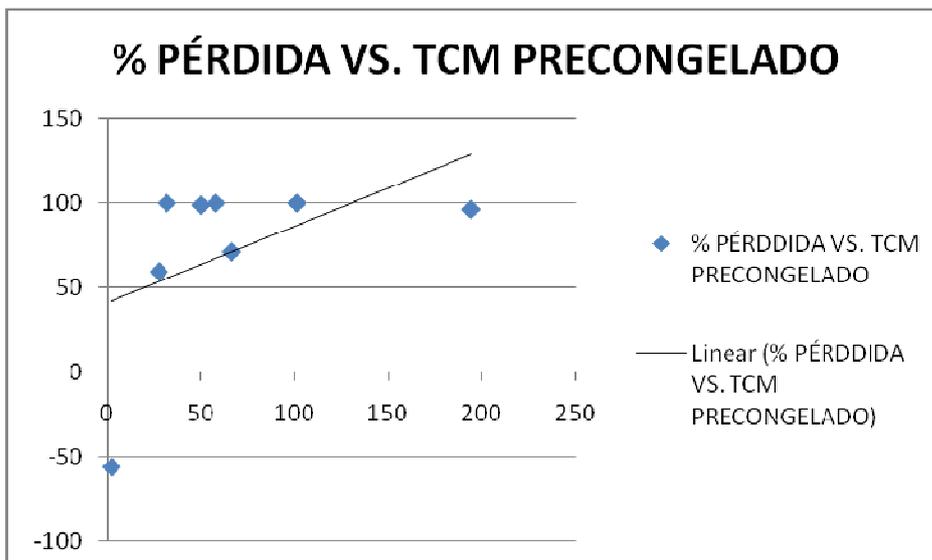
GRAFICA 2. CORRELACIÓN ENTRE EL PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES PERDIDOS Y EL TOTAL DE CELULAS MOVILES ANTES DEL CONGELADO EN VARONES SANOS CON FERTILIDAD COMPROBADA.



GRAFICA 3. CORRELACIÓN ENTRE EL PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS CON EL TOTAL DE CÉLULAS MÓVILES ANTES DEL CONGELADO EN PACIENTES CON FACTOR MASCULINO DE INFERTILIDAD.



GRAFICA 4. CORRELACIÓN ENTRE EL PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS CON EL TOTAL DE CÉLULAS MÓVILES ANTES DEL CONGELADO EN PACIENTES CON FACTOR MASCULINO DE INFERTILIDAD.



BIBLIOGRAFIA:

1. Özkavukcu S, Erdemli E. Cryopreservation: basic Knowledge and Biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*. 2002 (24); 187-196.
2. Watson, PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 1995; 781-791.
3. Oyarzún EE, Manssur YA. Fertilización asistida: reflexiones frente a una nueva legislación. *Revista Médica de Chile*. 1997; 222-227.
4. Alvarez-Diaz, JA. Historia contemporánea: Las técnicas complejas de reproducción asistida. *Ginecol Obstet Mex*. 2007; 293-302.
5. Emmens CW, Blackshaw AW. The low temperature storage of ram, bull and rabbit spermatozoa. *Aust Vet J*. 1950; 226-228.
6. Okuyama M, Isogai S, Saga M, Hamada H, Ogawa S. In vitro fertilization (IVF) and artificial insemination (AI) by cryopreserved spermatozoa in mouse. *J Fertil Implant*. 1990; 116–119.
7. Yokoyama M, Akiba H, Katsuki M, Nomura T. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Exp Anim*. 1990; 125–128.
8. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*. 1995 (346); 137–40.
9. Bielanski A, Bergeron H, Lau PC, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*. 2003 (46); 146–52.
10. Insemination, British Andrology Society. British Andrology Society guidelines for the screening of semen donors for donor. *Hum Reprod*. 1999 (14); 1823–6.
11. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 1984 Sep;247(3 Pt 1):C125-42.

12. Caballero P, Nuñez R, Vazquez I. Técnicas de congelación y descongelación del semen. *Inseminación artificial: Cuadernos de Medicina Reproductiva*. 1995 (1); 87-106.
13. Gao GY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Crister JK. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod*. 1993(49); 112-123.
14. Aitken RJ, Wang YF, Liu J, Best F, Richardson DW. The influence of medium composition osmolarity and albumin on acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int J Androl*. 1983 (6); 180-193.
15. Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Crister JK. Determination of optimal cryoprotectans and procedures for their addition and removal from human sperm spermatozoa. *Hum Reprod*. 1997 (12); 112-118.
16. Katkov II, Katkova N, Crister JK, Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentration of glycerol: chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*. 1998 (37); 325-338.
17. Chong AP. Artificial insemination and sperm banking: clinical and laboratory considerations. *Semin Reprod Endocrinol*. 1985 (3); 193-200.
18. Farrant J. *General principles of cell preservation*, Martinus-Nijhoff. Boston 1980; p6.
19. Stanic P, Tandara M, Sonicki Z, Simunic V, Radakovic B, Suchan. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000 (91); 65–70.
20. Paras J, Freisinger L, Esterbauer B, Schmeller N, Szlauer R, Jungwirth A. Cryopreservation technique: comparison of Test yolk buffer versus SpermCryo and vapour versus computerised freezing. 2008 (40); 18–22.
21. Isachenko V, Isachenko E, Montag M, Zueva V, Krivokharchenko I, Nawroth F, Dessole S, Katkov II, van der Ven H. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2005 (10); 350–354.
22. Watson. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 1995 (7); 781-791.

23. Crister JK, Huse-Benda AR, Aaker DD, Arneson BW, Ball GD. Criopreservation of human spermatozoa. Post-thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril*. 1987; 980-984.
24. Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. Efecto de los procesos de criopreservación. *Analecta Veterinaria*. 2005. 28-35.
25. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological system. *Science*. 1970; 939-949.
26. Parks JE, Grahan JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 1992; 209-222.
27. Mazur P, Leivo S P, Chu E H Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Experimental cell research*. 1972; 345-355.
28. Desrosiers P. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. *Fertility and Sterility*. 2006 (85); 1744-1752.
29. Hazel JR. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation?. *Annu Rev Physiol*. 1995 (57). 19–42.
30. Quinn PJ. Effects of temperature on cell membranes. Effects of temperature on cell membranes. *Symp Soc Exp Biol*. 1988(42); 237–58.
31. Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev*. 2001(59); 451– 8.
32. Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli FM, Rapone S, Dondero F, et al. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fertil*. 1995(26); 145– 8.
33. Chohan KR, Griffin JT, Carrell DT. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrología*. 2004(36); 321– 6.
34. Linfor JJ, Meyers SA. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. *J Androl*. 2002(23); 107– 13.
35. Lasso JL, Noiles EE, Alvarez JG, Storey BT. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J Androl*. 1994(15); 255– 65.

36. Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JL, Sullivan R. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J Androl.* 2000(21); 700–7.
37. Boue F, Blais J, Sullivan R. Surface localization of P34H an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. 1996(54). 1009–17.
38. Legare C, Gaudreault C, St-Jacques S, Sullivan R. P34H sperm protein is preferentially expressed by the human corpus epididymidis. *Endocrinology.* 1999 (40); 3318–27.
39. Boue F, Berube B, De Lamirande E, Gagnon C, Sullivan R. Human sperm–zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein. *Biol Reprod.* 1994(5); 577–87.
40. Mitchison TJ, Kirschner MW. Some thoughts on the partitioning of tubulin between monomer and polymer under conditions of dynamic instability. *Cell Biophys.* 1987(11); 35–55.
41. Magistrini M, Szollosi D. Effects of cold and of isopropyl-Nphenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes. *Eur J Cell Biol.* 1980(22); 699–707.
42. O'Brien ET, Salmon ED, Erickson HP. How calcium causes microtubule depolymerization. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1997(36); 125–35.
43. Boiso I, Marti M, Santalo J, Ponsa M, Barri PN, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod.* 2002(17); 1885–91.
44. Park SE, Son WY, Lee SH, Lee KA, Ko JJ, Cha KY. Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil Steril.* 1997(68); 920–6.
45. Schiller J, Arnhold J, Glander HJ, Arnold K. Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy—effects of freezing and thawing. *Chem Phys Lipids.* 2000(106); 145–56.
46. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation/thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalisation and not DNA fragmentation. *J Androl.* 2001(22); 646–51.

47. Zilli L, Schiavone R, Zonno V, Rossano R, Storelli C, Vilella S. Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. *Biol Reprod.* 2005(72); 1262–7.
48. Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, et al. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology.* 2004(62); 690–701.
49. Ollero M, Bescos O, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology.* 1998(49); 547–55.
50. Hammadeh ME, Askari AS, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl.* 1999(22); 155– 62.
51. Zenzes MT, Bielecki R, Casper RF, Leibo SP. Effects of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril.* 2001(75); 769–77.
52. Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human reprod.* 1987(2); 207–16.
53. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell.* 1994. 3rd ed; 467-573.
54. Bulinski JC, Gundersen GG. Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *Bioessays.* 1991(13); 285–93.
55. Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. **Nature.** 1985(312); 237–42.
56. Songsasen N, Yu IJ, Ratterree MS, VandeVoort CA, Leibo SP. Effect of chilling on the organization of tubulin and chromosomes in rhesus monkey oocytes. *Fertil Steril.* 2002(77); 818–25.
57. Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod.* 1987(2); 207–16.
58. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000 (2); 481–92.

59. Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spano M, Dondero F. Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell Tissue Bank*. 2006(7); 91–8.
60. Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH. Cryopreservation of human semen: comparison of cryopreservatives, sources of variability and prediction of post-thaw survival. *J Androl*. 1992(13); 283–8.
61. Muldrew K, Mc Gann LE. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys J*. 1990(57); 525–32.
62. Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, Montag M, Dessole S, Nawroth F, et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapour: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biol Reprod*. 2004(71); 1167–73.
63. Punyatanasakchai P, Sophonsritsuk A, Weerakiet S, Wansumrit S, Chompurat D. Comparison of cryopreserved human sperm in vapor and liquid phases of liquid nitrogen: effect on motility parameters, morphology and sperm function. *Fertil Steril*. 2008(90)(5); 1978-1981.
64. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod*. 2001 (16); 1191–9.
65. De Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N, Cedenho AP. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertil Steril*. 2006(86); 597–600.
66. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertile and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*. 2004(19); 129–38.
67. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril*. 200(73); 459–64.
68. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 1998(59); 1037–46.

69. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol.* 2007(33); 603–21.
70. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril.* 1997(68); 519–24.
71. Lopes S, Sun J, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1998(69); 528–32.
72. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage Clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ.* 2006 (175); 495–500.
73. Zribi N, Chakroun FN, Euch HE, Gargouri J. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and Sterility.* 2008 por publicar.
74. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, et al. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl.* 2000(21); 903–12.
75. Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN. Detection of apoptotic alterations Detection of apoptotic alterations quality. *Hum Repro.* 2002(17); 1266–73.
76. Shen HM, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male fertility. *Free Radic. Biol Med.* 2000(28). 529–36.
77. Floyd RA. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1990(11); 1447–50.
78. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility- a clinical perspective. *Hum Reprod update; Hum Reprod update.* 2008(14); 243–58.
79. Meseguer M, Martinez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohi J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril.* 2008(89). 1191–9.

80. Bell M, Wang R, Hellstrom WGJ, Sikka SC. Effect of cryopreservative additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *J Androl.* 1993(14); 472–8.
81. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril.* 2003(80); 531–5.
82. Li ZL, Lin QL, Liu RJ, Xie WY, Xiao WF. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2007(87); 3174–7.
83. Gadea J, Gumbao D, Cánovas S, García-Vázquez FA, Grullón LA, Gardón JC. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *Int J Androl.* 2008(31); 40–9.
84. Shamsi MB, Kumar R, Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *J Med Res Indian;* 2008(127). 115–23.
85. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.* 2006(12); 417–35.
86. Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reprod Biomed Online.* 2004(9); 134–51.
87. Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indication, methods and results. *J Urol.* 2003(170); 1079–84.
88. Trottman M, Becker AJ, Stadler T, Straub J, Sljanik I, Schlenker B, et al. Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. *Eur Urol.* 2007(52); 355–67.
89. Puschek E, Philip PA, Jeyendran RS. Male fertility preservation and cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 2004(30); 173–80.
90. Colpi GM, Contalbi GF, Nerva F, Sagone P, Piediferro G. Testicular function following chemo-radiotherapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;113(Suppl):S2–6.
91. Garrido N, Meseguer M. Bancos de Semen: Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana, laboratorio de reproducción asistida. 2007 Mc Graw Hill 3ra edición; 47-51.

92. Watson PF. Artificial insemination and the preservation of semen. Marshall's Physiology of Reproduction 2; Reproduction in the male – Edimburgo. 1990; 547-869).
93. Keel BA, Webster BW. Semen cryopreservation methodology and results- In "Donor insemination", Barrat and Cooke eds. Cambridge University Press. 1993.
94. Gónzora. Congelación espermática, una alternativa en el paciente oncológico. Gamo. 2005(4); 8-10.
95. Laufer N, Margalioth EJ, Navot D and Shemesh. Reduced penetration of zona-free hamster ova by cryopreserved human spermatozoa. Archives of Andrology. 1984(14) 217-22.
96. Serafini P and Marrs RP. Computerized staged-freezing technique improves sperm survival and preserves penetration of zona-free hamster ova. Fertil Steril. 1996(45); 854-8.
97. Niels J. Casteren V, Dohle G, Romijn J, et al. Semen cryopreservation in pubertal boys before gonadotoxic treatment and the role of endocrinologic evaluation in predicting sperm yield. Fertility and Sterility. 2008 por publicar.
98. Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SR, Aziz N, Agarwa A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. Fertility and Sterility. 2004(82); 913-918.
99. Prins GS and Weidel L. A comparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa. Fertil Steril. 1987(46); 147-9.
100. Hammit DG, Walker DL and Williamson RA. Concentration of glycerol required for optimal survival and in vitro fertilizing capacity of frozen sperm is dependent on cryopreservation medium. Fertil Steril. 1988(49); 680-7.
101. Holt WV, Shenfield F, Leonard T, Hartman TD. The value of sperm swimming speed measurements in assessing the fertility of human frozen semen. Human Reprod. 1989(4); 292-7.
102. Critser JD, Arneson BE, Aaker DV, Criopreservation of human spermatozoa. II, post thaw chronology of motility and of zona free hamster ova penetration. Fertil Steril. 1987(47); 980-4.
103. Sanchez I, Amoros D, Lucco F, Gonzales S, Ballesteros A, Pellicer A. Inseminación Artificial: Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana. Terecre Edición. Mc Graw Hill 2008; 23-40.

104. Maxwell W. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus: II. Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. *Anim Reprod Sci*; 1986; 309-316.
105. Maxwell Evans WMC, Evans G, Rhodes SL, Hillard M A, Bindon BM. Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviductal insemination with low number of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Repro Fertil Dev*; 1993; 57-63.
106. Van Voorhis BJ, Barnett MR, Sparks AE, Syrop CH, Rosenthal G, Dawson J. Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2001(75); 661-668.
107. Strandell A, Bergh C, Soderlund B, Lundin K, Nilsson L. Fallopian tube sperm perfusion: the impact of sperm count and morphology on pregnancy rates. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003(82);1023-1029.
108. Khalil MR, Rasmussen PE, Erb K, Laursen SB, Rex S, Westergaard LG. Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001(b;80);74-81.
109. Kahn JA, Sunde A, Koskemies A, Vuuring V, Sordal T, Christensen F, Molne K. Fallopian tube sperm perfusion (FSP) versus intrauterine insemination (IUI) in the treatment of unexplained infertility: a prospective randomized study. *Hum Reprod*. 1993(8): 890-894.
110. Silber SJ. Apparent fertility of human spermatozoa from the caput epididymis. *J Androl*. 1989(10); 263-269.
111. Gongora A. Spermatic freezing, an alternative in the oncological patient. *Gamo*. 2005(4); 21-23.
112. Galan A, Campos P, Blanco C, Salinas R, Cobo A. Inseminación de los ovocitos. *Manual Práctico de esterilidad y Reproducción Humana, laboratorio de reproducción asistida*. Mc Graw Hill. 3ra. Edición 2007; 151-156.
113. Trummer H, Tucker K, Young C, Kaula N, Meacham RB. Effect of storage temperature on sperm cryopreservation. *Fertil Steril* 1998;70:1162-4.