

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“COMPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO,
MEDIO DE CULTIVO, CRIOPROTECTOR Y METODOLOGÍA
MÁS EFICIENTE PARA LA CONGELACIÓN DE SEMEN
HUMANO”**

Presentada por:

Wendy Jackeline Montanez Hilares

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

LIMA - PERÚ

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“COMPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO,
MEDIO DE CULTIVO, CRIOPROTECTOR Y METODOLOGÍA
MÁS EFICIENTE PARA LA CONGELACIÓN DE SEMEN
HUMANO”**

Presentada por:

Wendy Jackeline Montanez Hilares

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dra. Marta Williams León de Castro
PRESIDENTE

Mg. Sc. Elva María Ríos Ríos
MIEMBRO

Blgo. Richar Joel Morales Rodríguez
MIEMBRO

Dr. Víctor Juan Meza Contreras
ASESOR

Mg. Sc. Luis Guzmán Masías
Co Asesor

DEDICATORIA

A Dios por su infinito amor y gracia en todo momento, por guiarme y sostenerme en las circunstancias más duras. Isaías 41:10 “No temas, porque yo estoy contigo; no desmayes, porque yo soy tu Dios que te esfuerzo; siempre te ayudaré, siempre te sustentaré con la diestra de mi justicia”

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por el apoyo constante, perseverancia y esfuerzo inmensurable para sus hijas.

A mi abuelita Julia, por sus palabras sabias, sus consejos y amor incondicional que llenaron mi vida por completo, por su insistencia en esforzarme en cada objetivo que me proponga.

A mis hermanas Josseline y Angie, por ser el motor de mi constancia, y tener las palabras de aliento que necesito.

A mi esposo Dan, por ser mi amigo a quien puedo confiarle todo, brindarme el apoyo emocional ante cualquier circunstancia y siempre mostrar una actitud paciente y confiada en Dios.

A mi asesor Víctor Meza, por apoyarme desde el inicio de la presentación de mi proyecto y la paciencia brindada.

A mi Co-Asesor Luis Guzmán, por el tiempo y apoyo en la redacción de mi tesis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	
ABSTRACT.....	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
1.1.1 OBJETIVO GENERAL	2
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 ESPERMATOZOIDE.....	3
2.2 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA	4
2.2.1 <i>In vivo</i>	4
2.2.2 <i>In vitro</i>	5
2.3 REACCIÓN DEL ACROSOMA.....	5
2.4 CONGELACIÓN.....	6
2.4.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).....	7
2.4.2 EFECTOS DE LA CONGELACIÓN	10
2.4.3 RESPUESTA CELULAR A LA CONGELACIÓN	12
2.5 DESCONGELACIÓN	13
2.6 LESIONES CRIOINDUCIDAS	14
2.7 VELOCIDAD DE ENFRIAMIENTO	14
2.7.1 RÁPIDO (FORMACIÓN DE HIELO INTRACELULAR).....	14
2.7.2 LENTO (ESTRÉS OSMÓTICO)	15
2.8 AGENTES CRIOPROTECTORES.....	15
2.8.1 PENETRANTES	16
2.8.2 NO PENETRANTES	16
2.8.3 BENEFICIOS	17
2.8.4 DESVENTAJAS	18

2.8.5	COMPONENTES.....	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1	LUGAR.....	22
3.2	RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA SEMINAL.....	22
3.3	EVALUACIÓN DE LA MUESTRA SEMINAL.....	22
3.4	SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS SEMINALES.....	22
3.4.1	TRATAMIENTOS DE CONGELACIÓN.....	23
3.4.2	TRATAMIENTOS DE DESCONGELACIÓN.....	24
3.4.3	TRATAMIENTOS POST DESCONGELACIÓN.....	25
3.4.4	MEDIO DE CULTIVO, CRIOPROTECTOR Y METODOLOGÍA.....	26
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
V.	CONCLUSIONES.....	45
VI.	RECOMENDACIONES.....	46
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
VIII.	ANEXOS.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación tratamientos de congelación	30
Tabla 2: Comparación tratamientos de descongelación	32
Tabla 3: Comparación tratamientos post descongelación. Antes y después de la capacitación espermática	35
Tabla 3.1: Comparación tratamientos post descongelación.	35
Tabla 4: Comparación de medios de cultivo	38
Tabla 4.1: Comparación de crioprotectores, utilizando diferentes medios de cultivo	39
Tabla 4.2: Comparación de los seis tratamientos (Medio de cultivo, criptotector y metodología).....	39
Tabla 5: Resultado de los espermogramas realizado a todos los pacientes normozoospermicos seleccionados.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de flujo de los cuatro tratamientos de congelación.....	23
Figura 2: Diagrama de flujo de los dos tratamientos de descongelación.....	24
Figura 3: Diagrama de flujo de los tres tratamientos post descongelación.....	26
Figura 4: Diagrama de flujo de los seis tratamientos de congelación utilizando dos medios de cultivo, dos crioprotectores y dos pocesos.....	27
Figura 5: Área de Toma de Muestra. Zona de Lavado e indicaciones para el paciente en español e inglés	59
Figura 6: Laboratorio de Andrología.....	61
Figura 7: Equipos. Microscopios, pipeteador, centrífuga, contómetro, estufa y cámara de flujo laminar.	62
Figura 8: Espermatograma.....	63
Figura 9: Viabilidad espermática.....	64
Figura 10: Capacitación espermática.....	65

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Materiales.....	57
Anexo 2: Área de Toma de Muestra.....	59
Anexo 3: Indicaciones en el Área de Toma de Muestra.....	60
Anexo 4: Laboratorio de Andrología	61
Anexo 5: Equipos del Laboratorio de Andrología.....	62
Anexo 6: Realización de Espermatograma.....	63
Anexo 7: Procedimiento de Capacitación Espermática por Gradiente de densidades	65
Anexo 8: Procedimiento de congelación.....	66
Anexo 9: Espermatograma de pacientes seleccionados.	67

RESUMEN

La congelación de semen humano toma cada vez mayor importancia, debido a que está dirigido a pacientes oncológicos y otros, que desean postergar la paternidad, y así preservar su fertilidad. Sin embargo, la muestra seminal sufre efectos adversos en la concentración de espermatozoides móviles progresivos después de su descongelación. El objetivo principal del estudio fue comparar distintos tratamientos de congelación, descongelación, post descongelación, medios de cultivo, crioprotectores y metodologías en función a la recuperación de espermatozoides móviles progresivos (E.M.P) luego de la descongelación, de esta manera determinar la eficiencia de cada tratamiento y así, optimizar el proceso completo de congelación. Este estudio prospectivo incluyó la evaluación de muestras seminales de pacientes anónimos realizado en un laboratorio privado de reproducción asistida, a partir de setiembre del 2017 hasta marzo del 2018, los cuales fueron seleccionados según los parámetros normales de la OMS (2010), que fueron el volumen, consistencia, concentración espermática, motilidad progresiva, viabilidad, morfología espermática y células redondas. Se encontraron diferencias significativas en la recuperación de espermatozoides móviles progresivos (E.M.P) en los tratamientos de congelación, descongelación, medios de cultivo, crioprotectores y metodologías. Por otra parte, no existen diferencias en los tratamientos post descongelación. En conclusión, el tiempo que permanece la muestra seminal a determinada temperatura, para congelación y descongelación influye en gran manera en la eficiencia de la recuperación de espermatozoides móviles progresivos del tratamiento aplicado. Por otro lado, el contenido de los medios de cultivo y crioprotectores también muestran influencia en la eficiencia. Finalmente, la congelación de la muestra con o sin plasma seminal, es un indicativo de la presencia de sustancias en el plasma seminal que ayudan a proteger a los espermatozoides, en consecuencia, existe una mayor eficiencia en la recuperación espermática en la congelación con plasma seminal.

Palabras clave: Congelación, espermatozoide, plasma seminal, motilidad progresiva, capacitación espermática, crioprotector.

ABSTRACT

The freezing of human semen takes on increasing importance, because it is aimed at cancer patients and others, who wish to postpone paternity, and preserve their fertility. However, the seminal sample suffers adverse effects in its concentration, progressive motility and vitality after thawing. The main objective of the study was to compare different treatments of freezing, thawing, post thawing, culture medium, cryoprotectants and methodologies based on the recovery of progressive motile sperm after thawing, in this way determining the efficiency of each treatment and thus, optimize the complete freezing process. This prospective study included the evaluation of seminal samples of anonymous patients performed in a private laboratory of assisted reproduction, from September 2017 to March 2018, which were selected according to the WHO normal parameters (2010), which were the volume, consistency, sperm concentration, progressive motility, vitality, sperm morphology and round cells. Significant differences were found in the recovery of progressive motile sperm in freezing, thawing, culture medium, cryoprotectant and methodologies. On the other hand, there are no differences in post thawing treatments. In conclusion, the time that the seminal sample remains at a certain temperature, for freezing and thawing, greatly influences the efficiency of the recovery of progressive motile sperm from the applied treatment. On the other hand, the content of culture medium and cryoprotectants also show influence on efficiency. Finally, the freezing of the sample with or without seminal plasma is an indication of the presence of substances in the seminal plasma that help to protect the sperm, consequently, there is a greater efficiency in sperm recovery in the freezing with seminal plasma.

Keywords: Freezing, sperm, seminal plasma, progressive motility, sperm capacitation, cryoprotectant.

I. INTRODUCCIÓN

La infertilidad se define como la incapacidad de lograr o mantener un embarazo clínico, luego de mantener relaciones sexuales regulares por un tiempo no menor a un año sin el uso de métodos anticonceptivos en mujeres menores a los 35 años de edad, y por un tiempo no mayor de seis meses en mujeres mayores a 35 años de edad (Zegers-Hochschild *et al.* 2009), considerándose un problema clínico importante en la actualidad, puesto que afecta al 8-12 por ciento de parejas en todo el mundo. Se estima que, el 40-50 por ciento de problemas de infertilidad es originado principalmente por factor masculino, como problema único o en conjunto con el factor femenino (Kumar y Singh 2015).

La infertilidad del factor masculino se presenta como una alteración en la concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides, de forma individual o en conjunto, afectando aproximadamente al 7 por ciento de todos los hombres. Se han publicado varios estudios que indican una disminución en la calidad seminal a nivel mundial, aproximadamente un 50 por ciento en los últimos 50 a 60 años (Carlsen *et al.* 1992). En el año 2000, se realizó un metanálisis completo actualizado, que también confirmó la tendencia a la reducción de la calidad seminal (Swan *et al.* 2000).

Dada la tendencia a la disminución de la calidad seminal, considerando que, actualmente las parejas optan por aplazar la paternidad, surge la congelación espermática, ya que se pueden mantener los mismos parámetros del momento en el que se realiza la congelación, y no se vea afectada por el tiempo a transcurrir. Esto también se lleva a cabo por otras razones tales como, pacientes oncológicos que desean preservar su fertilidad previa a tratamientos que la comprometan, pacientes que se van a realizar una vasectomía, pacientes que desean un tratamiento de reproducción asistida en una fecha posterior y muestras de donantes para el banco de semen.

Si bien es cierto, la congelación espermática se ha convertido en una técnica muy útil, sin embargo, la muestra seminal sufre efectos adversos en la concentración de espermatozoides móviles progresivos después de su descongelación, debido a que en la actualidad los métodos que son empleados para la congelación de espermatozoides no son tan rigurosos en comparación con los métodos utilizados para congelar embriones humanos (Royere *et al.* 1996).

Esta investigación sugiere que, la congelación de semen humano puede ser optimizado utilizando el mejor tratamiento de congelación, descongelación, post descongelación, medio de cultivo, crioprotector y metodología, en conjunto, recuperando una mayor concentración de espermatozoides móviles progresivos (E.M.P) después de su descongelación.

1.1 OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

- Comparar la recuperación de espermatozoides móviles progresivos (E.M.P) de diferentes tratamientos para la congelación de semen humano, y así optimizar el proceso completo de congelación, identificando los que obtengan la mayor recuperación de E.M.P.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la recuperación de E.M.P de cuatro tratamientos de congelación e identificar el más eficiente.
- Comparar la recuperación de E.M.P de dos tratamientos de descongelación e identificar el más eficiente.
- Comparar la recuperación de E.M.P de dos tratamientos post descongelación e identificar el más eficiente.
- Comparar la recuperación de E.M.P de dos marcas comerciales de medios de cultivo y crioprotector (Irvine Scientific® y LifeGlobal Group®), dos metodologías (congelación con y sin plasma seminal), e identificar los más eficientes.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula haploide con una longitud de 45 a 50 μm y la velocidad de desplazamiento es de 75 $\mu\text{m}/\text{segundo}$. Es una célula altamente especializada y condensada que se mantiene en su tamaño original y no se divide, su función principal es la de transportar el material genético (ADN) a un ovocito. Consta de: Cabeza, pieza intermedia y cola. No presentan retículo endoplasmático, aparato de Golgi ni ribosomas, para así maximizar su eficiencia al transportar el ADN (Falcone & Hurd, 2007).

La cabeza del espermatozoide es oval de 4 a 5.5 μm de longitud, 2.5 a 3.5 μm de ancho, considerando una relación normal entre longitud y ancho de 1.5 a 1.7. (Menkveld *et al.* 1990). El acrosoma surge del aparato de Golgi de la espermátida y cubre aproximadamente dos tercios de la parte anterior de la cabeza (40 – 70 por ciento) (Kruger *et al.* 1986 y Menkveld *et al.* 1990). El cuello es la unión entre la cabeza y cola, y su ausencia es una anomalía común (Menkveld *et al.* 1990), es una región muy frágil. Durante la espermatogénesis, el centriolo se diferencia en tres etapas: Pieza media, pieza principal y pieza final. En la pieza intermedia se organizan las mitocondrias. La vaina de la pieza intermedia que está rodeada de mitocondrias es muy corta (Menkveld *et al.* 1990).

La membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se fusionan al fertilizar el ovocito, generando la liberación en diversos sitios de las enzimas acrosómicas durante la reacción acrosómica (Barros y Franklin 1968), contiene enzimas hidrolíticas tales como, hialuronidasa y acrosina, necesarias para la fertilización. El núcleo está compuesto de ADN conjugado con proteína, abarca el 65 por ciento de la cabeza, la cromatina está herméticamente compactado, por lo que no se puede reconocer cromosomas diferentes. El cuello es la unión entre la cabeza y cola, y su ausencia es una anomalía común (Menkveld *et al.* 1990).

La cola mide aproximadamente 40 a 50 μm contiene todo el aparato de motilidad y se impulsa por ondas que se generan en la región del cuello. Está compuesto de un núcleo axial que consta de dos fibrillas centrales y están rodeados por un anillo concéntrico de nueve dobles fibrillas hasta el final de la cola (Menkveld *et al.* 1990).

En hombres entre 21 y 30 años de edad cuentan con reservas bastante considerables de espermatozoides en el epidídimo, aproximadamente 229 millones en promedio, sin embargo, la edad, temporada, nivel de excitación sexual, tamaño testicular y frecuencia de eyaculación influyen en el número de espermatozoides eyaculados, sumado a ello, influye la nutrición, el consumo de drogas terapéuticas, hormonas y sus metabolitos, aumento de la temperatura escrotal, sustancias tóxicas o radiación, pueden disminuir o dañar fuertemente la espermatogénesis (Menkveld *et al.* 1990).

2.2 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

2.2.1 *In vivo*

La capacitación espermática es un proceso que deben pasar los espermatozoides para poder fecundar un óvulo. Adquieren la capacidad de someterse a la reacción acrosómica, y así unirse a la zona pelúcida y adquirir hipermotilidad, sin embargo, no implica algún cambio morfológico ni a nivel ultraestructural. Implica sólo la organización molecular, manteniendo el espermatozoide intacto, eliminación de factores del plasma seminal que recubren la superficie del espermatozoide, modificación de la carga superficial, modificación de la membrana espermática y esteroides, lípidos y glicoproteínas y la membrana acrosomal externa, aumento de calcio intracelular libre (Thomas y Meizel 1989), cambios en el metabolismo espermático y la activación de las enzimas acrosómicas.

Se lleva a cabo cuando los espermatozoides ingresan al aparato reproductor femenino, en donde cambian los lípidos y proteínas de la membrana espermática, además de la liberación de colesterol de membrana, todo ello para preparar al espermatozoide para su interacción con el ovocito y se puede dar inicio desde la migración de los espermatozoides a través del moco cervical. Y continúa por la adquisición de hipermotilidad, en el que se observa aumento de la velocidad, es necesario para evitar el apego al epitelio de la trompa de Falopio, además de penetrar el cúmulo y la zona pelúcida (Langlais *et al.* 1981).

2.2.2 *In vitro*

Se eliminan espermatozoides inmóviles y plasma seminal, que tiene sustancias tóxicas que pueden dañar a los espermatozoides, esto ocurre mediante la purificación del eyaculado mediante distintas técnicas con el único objetivo de obtener la mayor cantidad de espermatozoides móviles progresivos; Es posible inducirla mediante medios de cultivo suplementados con sustratos apropiados para brindar energía y presencia de proteínas o fluido biológico que pueden ser el suero o fluido de folículo. El espermatozoide presenta una motilidad hiperactivada en el momento que penetra la capa de células del cumulus, la cual rodea al ovocito, debido a que ha pasado por un proceso de capacitación (Velásquez 2009).

2.3 REACCIÓN DEL ACROSOMA

La reacción acrosómica brinda la capacidad de penetrar la zona pelúcida. Existen diferentes puntos en los que ocurre la fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal. Todos los cambios que suceden en la reacción acrosómica preparan al espermatozoide para fusionarse con la membrana del ovocito. Para ello se requiere de la eliminación del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide (Ravnik *et al.* 1992). A su vez, las lectinas se unen a D-manosa lo que aporta unión a la zona pelúcida (Benoff *et al.* 1993).

En el momento que el espermatozoide capacitado se encuentra en la zona pelúcida, realiza la reacción acrosomal, proceso sumamente importante para la fertilización del óvulo, la membrana externa del acrosoma (gran gránulo secretorio que contiene proteasas y hialuronidasas) libera su contenido cuando se fusiona con la membrana plasmática del espermatozoide. Tanto la interacción, penetración de la zona pelúcida por el espermatozoide como la fusión de las membranas del espermatozoides y ovocito son claves para el proceso de fertilización (Velásquez 2009).

No está del todo aclarado el mecanismo por el que el espermatozoide humano interactúa con la zona pelúcida del ovocito. Aunque algunas investigaciones mencionan que en la zona pelúcida se encuentra una glucoproteína compleja la cual interactúa con una proteína asociada al carbohidrato de la superficie espermática (Benoff *et al.* 1993)

2.4 CONGELACIÓN

La congelación de semen humano o criopreservación está siendo considerablemente empleada en los centros de reproducción asistida, y así preservamos la fertilidad masculina. Se lleva a cabo en pacientes que se van a someter a quimioterapia citotóxica, tratamientos quirúrgicos, radioterapia, dado que podría conducir a dificultades en la eyaculación o alguna falla testicular. Es por ello que se recomienda congelar el esperma antes de someterse a cualquier tipo de tratamiento que compromete la fertilidad masculina, de esta manera se podrá utilizar para un futuro procedimiento *in vitro*, ya sea fertilización *in vitro* (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Donnelly *et al.* 2011).

Los centros de reproducción asistida, en su mayoría cuentan con un banco de semen de donantes calificados, por lo que sus muestras tienen que ser congeladas por un periodo de tiempo determinado hasta que se confirme totalmente libre de infecciones como el VIH o hepatitis B antes de poder ser utilizado en una paciente que se encuentre interesada en adquirir muestra de donante de esperma para inseminación intrauterina (IIU), FIV o ICSI (Donnelly *et al.* 2011).

Las metodologías en la congelación varían, obteniendo una pobre recuperación de espermatozoides al descongelar las muestras, lo que se da a notar en la reducción de motilidad, velocidad y viabilidad. Una de las técnicas más utilizadas al descongelar muestras seminales es Swim Up, sin embargo, se ha informado anteriormente que la recuperación es pobre. Dado esto, se ha sugerido la posibilidad de capacitar el semen antes de congelarlo, puesto que permite la selección y aislamiento de los mejores espermatozoides (motilidad y morfología) (Barthelemy *et al.* 2011).

Se ha demostrado que congelar el esperma no presenta efectos adversos en el potencial de fertilización después de descongelarlo. A pesar de ello, se sabe que los espermatozoides con material genético dañado también son capaces de fertilizar un óvulo, en consecuencia, los defectos y mutaciones recién se dan a notar después que el embrión se haya dividido o el feto se haya desarrollado (Twigg *et al.* 1871), además presentó la primera evidencia de que espermatozoides humanos dañados genéticamente son capaces de generar pronúcleos normales en los ovocitos después de realizar un tratamiento de reproducción asistida como ICSI.

2.4.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Tienen un rol funcional como mensajeros en diferentes tipos de células (Aitken *et al.* 1994). No obstante, su elevada producción y control conduce a ser factor importante de diversas patologías, sobre todo en la fertilidad masculina (Zini *et al.* 1993). Su producción está relacionada con la disminución de la motilidad y con una reducción de la capacidad para la fusión espermatozoide-ovocito (Aitken *et al.* 1994). El efecto protector del plasma seminal evita que se generen efectos perjudiciales (Kovalski *et al.* 1992).

En el plasma seminal se encuentra el ácido ascórbico en altas concentraciones, lo que indica un papel fisiológico importante como antioxidante, además se ha detectado en bajas concentraciones en los espermatozoides, otorgándole así las condiciones necesarias al estar fuera del fluido seminal. Su concentración en pacientes fértiles normozoospermicos y pacientes infértiles no presenta diferencias significativas, por lo que concluyeron que la presencia del ácido ascórbico no influye en la fertilidad (Thiele *et al.* 1995)

En un estudio previo se determinó que, a mayor concentración de ROS en el plasma seminal, menor concentración de ácido ascórbico, en otras palabras, este resultado se debe a su utilización en su papel biológico como antioxidante combatiendo los radicales libres y no se debe a un defecto en el mecanismo de concentración en las vesículas seminales de hombres astenozoospermicos (Thiele *et al.* 1995). Además, se ha detectado actividad de ROS en pacientes infértiles, que no es debido a la reducción de la capacidad de captura sino a un aumento en su generación.

Los aniones superóxido son un sustrato importante para OH^- y H_2O_2 , estudios recientes mencionan que son particularmente citotóxicos para los espermatozoides generando la reducción de su función debido a la adición de catalasa o hidroxilo que son secuestradores de radicales libres. Existe otro contribuyente de la capacidad antioxidante presente en el plasma seminal, se trata del urato, el cual es similar a los del plasma sanguíneo. En pacientes fértiles e infértiles se encontró similares niveles de urato y no se ven afectados por la presencia de ROS (Halliwell *et al.* 1986).

El mecanismo antioxidante que rodea a los espermatozoides involucra antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Smith *et al.* 1996). Las enzimas antioxidantes son: catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Pahune *et al.* 2013). Por otra parte,

el mecanismo no enzimático en su mayoría incluye moléculas antioxidantes como: ácido ascórbico, glutatión, carotinas, taurina, piruvato, ubiquinol, L-carnitina, urato y α -tocoferol. (Zini *et al.* 2011).

Las consecuencias de la congelación han sido reportadas y publicadas en una serie de estudios. Uno de ellos concluye que, la congelación de semen humano reduce la actividad antioxidante de L- carnitina (Grizard *et al.* 1992). Gadea *et al.* (2011) demostraron que el contenido de glutatión se reduce significativamente después de congelar el semen humano (Gadea *et al.* 2011). A su vez, se observó una reducción significativa de la enzima superóxido dismutasa después de congelar (Lasso *et al.* 1994).

A pesar de comprobar que el contenido de antioxidantes se reduce significativamente después de congelar el semen, aún no se ha determinado la capacidad antioxidante del semen y dicha reducción está directamente relacionada con la edad, según Banihani *et al.* (2014), esta investigación fue la primera en evaluar el efecto directo de la congelación sobre la capacidad antioxidante total del semen humano en hombres infértiles. Demostrando que la congelación de semen humano reduce significativamente el nivel de su capacidad antioxidante total.

En el estudio realizado por Twigg *et al.* (1871) mencionan que es muy conocido que se cause daño en la cromatina y ADN, ya que se encuentran en el semen de los hombres, por esta razón investigaron el papel de ROS en la rotura de la cadena de ADN, inducción del daño de la cromatina y su posterior capacidad de los espermatozoides para descondensarse y poder formar los pronúcleos después de la ICSI, se llegó a la conclusión que, en condiciones de estrés oxidativo, es decir en presencia de una alta concentración de estos, la cromatina espermática humana exhibe una mayor rotura de la cadena de ADN, sin embargo, la velocidad en la que se forman los pronúcleos no presenta diferencia con los espermatozoides sin ADN fragmentado (Cathcart *et al.* 1984).

Según Donnelly *et al.* (2011), la pobre recuperación de espermatozoides móviles después de congelarlos es debido a cambios en la transición de fase líquida y por un notorio aumento de la peroxidación lipídica. En un estudio que realizaron en el año 2001, determinaron que el realizar gradiente de densidades utilizando Percoll antes de su congelación se obtiene un mayor daño en el ADN, mostrando una menor resistencia a la congelación. Por el contrario, el congelar los espermatozoides con el plasma seminal ha demostrado ser más resistente a la congelación, lo cual es asociado a la presencia de

antioxidantes en el plasma seminal, lo que brinda protección a la congelación (Lewis *et al.* 1997).

Las células somáticas contienen antioxidante en su citoplasma, sin embargo, los espermatozoides presentan una gran desventaja, ya que pierden gran parte de su citoplasma en la etapa de maduración, en consecuencia carecen de mecanismos de reparación endógenos y defensas enzimáticas, las enzimas presentes tales como: superóxido dismutasa y catalasa, se encargan de eliminar ROS como O_2 y H_2O_2 (Halliwell *et al.* 1989) además albúmina y taurina. Por esta razón estudios previos indican que limitar a los espermatozoides de los antioxidantes presentes en el plasma seminal conduce al daño al ADN (Donnelly *et al.* 2000).

Según Donnelly *et al.* (2011), se obtiene una mayor concentración de espermatozoides móviles cuando se ha capacitado la muestra seminal a diferencia de la muestra original en fresco, no obstante, al congelar en ambos casos, hay una mayor recuperación de E.M.P cuando se ha congelado la muestra original en fresco, es decir con plasma seminal. Además, determinaron que no se encuentra diferencia significativa en la integridad del ADN al capacitar las muestras seminales utilizando el método de gradientes de densidad y swim up. Se ha determinado que la congelación de semen humano reduce la motilidad de los espermatozoides en aproximadamente 30 por ciento ya sea en pacientes fértiles e infértiles (Mossad *et al.* 1994), siendo en estos últimos una mayor disminución.

Esta disminución la explican Aitken *et al.* (1987), se debe principalmente a la presencia del plasma seminal, el cual contiene antioxidantes que evitan el daño por ataque de radicales libres, los que lesionan a los espermatozoides, los que carecen de mecanismos de reparación. Aitken *et al.* (1989) indicaron que la alta producción de ROS, que se genera al someter células a un shock térmico, está muy asociada con la pérdida de motilidad espermática. Asegura que existe una correlación inversa entre la cantidad de ROS en el semen y porcentaje de E.M.P.

Debido a la eliminación y dilución de plasma seminal, al congelar, los espermatozoides experimentan una reducción significativa en su contenido antioxidante como, glutatión, carotenoides, taurina, hipotaurina, ascorbato, urato y α -tocoferol. Este descenso incrementa la posibilidad de exponer la membrana plasmática a la lesión oxidativa. Además, la membrana plasmática de los espermatozoides posee grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados que pueden ser fácilmente oxidados por las ROS (Tatone *et*

al. 2010). Es por ello, que los medios crioprotectores fabricados son complementados con antioxidantes, no obstante, la cantidad de estos antioxidantes estandarizados no es adecuada para la recuperación de espermatozoides después de su descongelación.

En la investigación de Banihani *et al.* (2016)., midieron la absorbancia a 450nm utilizando plasma seminal después de la congelación resultando 0.65, a su vez, la absorbancia a 450nm para plasma seminal con medio crioprotector después de su descongelación resultando en 0.98. Por lo que determinaron que en el segundo caso hubo un incremento de 69 por ciento en la absorbancia, por tanto, la cantidad total de antioxidante que rodea los espermatozoides. Estos antioxidantes en general se consideran una espada de doble filo con efectos contrarios si la dosis umbral de seguridad se supera.

Donnelly *et al* (1999) demostraron que concentraciones más altas de 20 μ M de vitamina C, antioxidante clave en el semen humano, posee efectos negativos sobre la calidad de los espermatozoides, sobre todo en la motilidad de los mismos. Por otro lado, Banihani *et al.* (2016), evidenciaron que dosis más altas de 50 mM de L-carnitina, potente antioxidante presente en el semen humano, disminuye en gran medida la motilidad y viabilidad de los espermatozoides en el semen humano. Por esta razón, utilizar una cantidad de antioxidantes no estandarizado en el medio que rodea los espermatozoides, puede producir una baja recuperación de estos al descongelarlos, también determinaron que no existe una correlación entre la disminución de la capacidad antioxidante y la edad.

2.4.2 EFECTOS DE LA CONGELACIÓN

La congelación de semen humano a bajas temperaturas (-196°C), es una opción factible para la preservación de la fertilidad de pacientes que han sido diagnosticados con cáncer antes de someterse a una intervención médica (Zakova *et al.* 2014). Además, es sumamente importante en determinados casos tales como, pacientes con mala calidad seminal o falla testicular (Verheyen *et al.* 2004), necesariamente conlleva a una reducción de la motilidad, lo que va a limitar su uso en técnicas de reproducción asistida de baja complejidad tal como: inseminación intrauterina.

Puesto que, la congelación induce la formación de ROS en el semen humano otros estudios determinaron que la congelación y descongelación conduce a alteraciones en NADPH oxidasa en la membrana plasmática y en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, los que evitan la formación de estos, a causa de esta alteración se le atribuye a la congelación su acumulación, conduciendo a estrés oxidativo, desequilibrio

entre oxidantes y antioxidantes, y peroxidación lipídica, teniendo como consecuencia una reducción en la recuperación post descongelación de los espermatozoides (Nada *et al.* 2015).

Brugh *et al.* (2003), indican que durante la congelación ocurre ruptura de la membrana, lo que en la mayoría de casos se debe a la formación de cristales de hielo intracelulares durante el enfriamiento rápido, efectos mecánicos de la fuerza del hielo extracelular durante el enfriamiento lento o efectos osmóticos. Además, Mossad *et al.* (1994) compararon las propiedades funcionales de los espermatozoides humanos antes y después de su congelación y determinaron que se produce un daño extenso en la membrana de los espermatozoides, lo que se ve reflejado en la reducción de E.M.P. No obstante, no está totalmente dilucidado la medida del daño de la membrana y si es el único factor responsable de esta reducción y baja viabilidad.

No existe alguna característica del semen fresco que prediga su capacidad para sobrevivir a la congelación y descongelación, con respecto a la motilidad progresiva y velocidad. Sus resultados indican que las personas con teratozoospermia leve y moderada y astenoteratozoospermia pueden producir parámetros de motilidad aceptables. Por lo que, concluyeron que sus muestras podrían ser utilizadas individualmente o agrupadas si es necesario para tratamientos de reproducción asistida de baja complejidad (Mossad *et al.* 1994).

El tamaño y la permeabilidad son las características principales que ayudan a definir el comportamiento de la membrana. El tamaño es el área disponible para intercambiar agua con el medio exterior. La permeabilidad es la viabilidad con la que el agua atraviesa la membrana frente a un gradiente de concentraciones. Menor es la permeabilidad de la membrana cuando la temperatura del sistema es menor, por esta razón la membrana celular pasa de ser semipermeable a ser impermeable por debajo de una temperatura crítica. En el momento que enfriamos y pasamos el umbral de temperatura, la deshidratación se detiene por tanto la formación de hielo intracelular aumenta. Además, la permeabilidad celular no sólo varía con la temperatura sino también de la concentración de soluto en el medio extracelular (Brugh *et al.* 2003)

2.4.3 RESPUESTA CELULAR A LA CONGELACIÓN

SHOCK POR FRÍO Y DAÑO DE ENFRIAMIENTO (37°C a 0°C)

Se le denomina shock por frío al daño celular causado por efectos de transición en la fase lipídica generado por el frío, ya que la célula es sensible a la velocidad de enfriamiento. Los ácidos grasos existen en un estado rígido ordenado (gel) o flexible desordenado (fluido). En un rango de temperaturas se genera la transición de un estado a otro. La temperatura de transición de fase (T_m “melting temperature”) va a depender de la composición de los ácidos grasos de la membrana, en el caso de células eucariotas, en su mayoría tienen su T_m entre 0°C y 20°C (Drobnis *et al.* 1993).

Esta transición de fase no ocurre a la vez en todos sus fosfolípidos de membrana, por esta razón se espera la posibilidad de la coexistencia entre estado fluido y gel durante esta transición. Esta coexistencia genera defectos en el empaquetamiento de las membranas y se ha asociado a una mayor permeabilidad de solutos. De esta manera, se demostró que cuando se alcanza la temperatura de transición, se tiene como consecuencia la pérdida de solutos a través de la membrana. Estas alteraciones transitorias de la fase lipídica tienen como resultado respuestas cinéticas no lineales en algunas enzimas, tales como ATPasas de membrana, lo que se asocia al descontrol de la concentración de calcio celular, a partir de una temperatura menor a 17°C (Bailey *et al.* 1994). El shock térmico puede ser mermado por agentes crioprotectores, presencia de fosfolípidos como fosfatidil serina, congelación lenta y un previo acondicionamiento en un medio con alto contenido de sales (Holt 2000).

FORMACIÓN DE HIELO (0°C a -132°C)

El método de enfriamiento va a determinar la respuesta de las células al enfriamiento. En efecto, la velocidad de enfriamiento es el parámetro crítico, por lo que determina los resultados después de la descongelación. El punto de congelación (punto crioscópico, -5°C y -10°C) disminuye por la presencia de solutos en el agua, es por esto que la cristalización del agua se produce a una menor temperatura en lugar de 0°C que es la temperatura de cristalización del agua pura, generando un sobreenfriamiento de la muestra (Mazur 1977).

La formación del hielo se da de manera aleatoria y va a depender de la formación de un punto de nucleación, el cual se refiere al inicio de la formación de hielo que es inversamente proporcional a la temperatura, en otras palabras, a mayor diferencia entre la temperatura a la que inicia la formación de hielo y temperatura de cambio de fase (T_m), aumenta el crecimiento de los cristales de hielo. Esto conduce a lo siguiente, si la temperatura a la que inicia la formación de hielo es demasiado baja, ya sea por una alta cantidad de solutos en el medio extracelular, aumenta de manera explosiva el crecimiento de los cristales de hielo, generando que estos atraviesen las células y dando como resultado destrucción de las células por completo (Brugh *et al.* 2003).

Es por esto que en muchos protocolos se induce la formación de hielo extracelular (nucleación) por medio de un descenso brusco de temperatura, de esta manera se aseguran que se tenga hielo en el momento que el sistema presente la temperatura de cambio de fase. Este descenso de temperatura brusco inducido busca evitar fluctuaciones de temperatura en las membranas celulares. Al congelarse el medio de congelación se libera calor por la formación de cristales que va a provocar un aumento en la temperatura, por lo que la temperatura de las células no disminuye en paralelo con la caída de temperatura de congelación, es más, la temperatura de la muestra puede permanecer estática por 2 a 3 minutos antes de seguir el curso del enfriamiento. Diversos estudios han demostrado que, entre la formación de hielo y reanudación de enfriamiento, es perjudicial para la viabilidad celular (Fuller y Paynter 2004).

Por tanto, la formación de hielo extracelular tiene la consecuencia de liberar el agua del interior de la célula hacia el medio extracelular, conocido como deshidratación celular. Por el momento no se ha dado la formación de hielo intracelular ($< -10^{\circ}\text{C}$) por la barrera física de la membrana celular. La probabilidad es menor para el inicio de la nucleación en el medio intracelular que en el medio extracelular, dado que la nucleación está directamente relacionada con el tamaño del compartimento a congelar (Mazur 1963). Sin embargo, la formación de hielo en el medio extracelular podría impedir que se forme hielo en el interior de la célula, debido a que, al aumentar la concentración de solutos dentro de la célula, el punto crioscópico disminuye.

2.5 DESCONGELACIÓN

En este proceso, los cambios osmóticos se darán al inverso de la congelación. La concentración de solutos en el medio extracelular se reduce rápidamente, la célula se

hidrata y así equilibrar la diferencia de concentraciones entre el medio extra e intracelular. En la mayoría de casos, se ha considerado que, para recuperar un mayor número de células, es necesario un recalentamiento rápido, puesto que es posible que pequeños cristales de hielo en el interior de la célula generados durante la congelación pueden crecer en un proceso de recalentamiento lento, este proceso es conocido como recrystalización, por tal razón se atribuyó la posibilidad de si el calentamiento es tan rápido podría evitar el crecimiento de los cristales de hielo (Rall *et al.* 1980).

2.6 LESIONES CRIOINDUCIDAS

A una temperatura de -132° C, el agua del medio se encuentra en estado sólido en su totalidad y los canales en el que se encuentran las células presentan una alta viscosidad (estado vítreo) sin cristalización, en este estado los fenómenos de difusión de las reacciones bioquímicas no pueden ocurrir (Mazur 1984). La formación de hielo extracelular no es la causante del daño celular porque las células se encuentran y mantienen en estos canales altamente viscosos que no están congelados mientras ocurre el crecimiento de los cristales de hielo en la solución extracelular (Nei 1978).

Otros estudios han mostrado que, al enfriar muestras a velocidades altas, la viabilidad de las células disminuye conforme se incrementa la velocidad de enfriamiento. Por el contrario, cuando se enfría muestras a velocidades bajas, la viabilidad de las células disminuye conforme disminuye la velocidad de enfriamiento. El porcentaje de supervivencia celular se coloca en función de la velocidad de enfriamiento (Leibo *et al.* 1970), se propone dos mecanismos diferentes causantes de los daños en las células criopreservadas, originado por producción de hielo y deshidratación celular o estrés osmótico, revelando la importancia de cada factor en la velocidad de congelación.

2.7 VELOCIDAD DE ENFRIAMIENTO

2.7.1 RÁPIDO (FORMACIÓN DE HIELO INTRACELULAR)

Lo que ocurra en el interior de la célula va a depender únicamente de la velocidad de enfriamiento (Mazur 1963; Nei *et al.* 1970). Si la velocidad de enfriamiento es muy rápida, cabe la posibilidad de que la célula no se deshidrate igual de rápido por lo que no se deshidrataría por completo, generando que el agua restante en el interior de la célula se congele y forme hielo. El hielo formado en el interior de la célula y el cómo daña a la célula es aún desconocido, pero se asume que se genera disfunción de origen mecánico

de las propiedades de la membrana celular y de estructuras celulares que se encuentran suspendidas en el interior, tales como orgánulos o grandes macromoléculas de proteínas. En definitiva, a mayor cantidad de hielo formado en el interior de la célula, menor posibilidad de que sobreviva.

2.7.2 LENTO (ESTRÉS OSMÓTICO)

En contraste con lo anterior se puede suponer que un tratamiento de congelación óptimo sería aquel en el que la velocidad de enfriamiento sea lenta, para que así se evite la formación de hielo en el interior de la célula ya que permitiría la salida de toda el agua intracelular. No obstante, el enfriamiento lento también generaría otro tipo de daño celular, se ha relacionado con la deformación mecánica de la célula, puesto que el proceso de deshidratación es tan intenso que se genera una reducción de tamaño, además por la exposición prolongada de altas concentraciones de electrolitos, este proceso se denomina “Efecto de solución” (Mazur *et al.* 1970).

Al enfriarse el agua líquida va formando cristales, pero no de forma homogénea, por lo que coexisten dos estados en simultáneo, líquido y sólido. El agua que se encuentra en estado líquido va tornándose más viscosa hasta que llega a una temperatura de -132°C , temperatura en la que por su alta viscosidad no le permite convertirse en cristal, esta fase por la que pasa se denomina estado vítreo. Para que las actividades biológicas cesen requieren estar a una temperatura aproximada de -132°C , así se reduce la longevidad celular por solo un periodo de semanas o meses ya que aún puede existir agua líquida y por ende se puede llevar a cabo actividad celular (Nijs *et al.* 2001).

El estado vítreo, es un fenómeno que ocurre progresivamente entre -90°C y -132°C y no ocurre repentinamente a una temperatura de -132°C . Los daños de recrystalización ocurren cuando una célula congelada a -196°C pasa a -80°C ya que algunas moléculas de agua vuelven a estado líquido y pueden convertirse en cristales, considerando que estos pequeños daños son acumulativos y cada cambio de temperatura que se genere a partir de -132°C reducirá considerablemente la supervivencia de las células criopreservadas (Nijs *et al.* 2001).

2.8 AGENTES CRIOPROTECTORES

No sólo es llevar a cabo una adecuada velocidad de enfriamiento, sino también considerar otros factores que influyen en la supervivencia de las células congeladas, para ello es necesario alterar el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las que

tiene lugar la congelación, tal es el caso de los agentes crioprotectores. Los agentes crioprotectores son sustancias muy hidrosolubles, de baja citotoxicidad, que reducen el punto eutéctico de una solución. El punto eutéctico se refiere a la temperatura mínima a la que una solución se encuentra aún en estado líquido. Al reducirse, se alcanzará una concentración de solutos a una temperatura mucho menor, dado que en el momento en el que se induce la nucleación en el medio extracelular, la célula se encontrará más hidratada y el gradiente osmótico al que se verá sometida será menor en el momento que se está congelando (Lewis *et al.* 1997).

2.8.1 PENETRANTES

Sustancias permeables a través de la membrana debido a su bajo peso molecular, evitan las lesiones producidas por la congelación a velocidad lenta. Ejemplos de ellos son: Dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol (EG), glicerol, 1,2-propanodiol. Todos los crioprotectores mencionados tienen en común que sus moléculas son pequeñas lo que les va a permitir atravesar la membrana celular, considerando que su permeabilidad no es de la misma magnitud que la del agua (Gilmore *et al.* 1997).

2.8.2 NO PENETRANTES

Sustancias de alto peso molecular, evitan las lesiones producidas por la congelación a velocidad alta. En comparación con los crioprotectores penetrantes, su tamaño es superior. Por lo que no son crioprotectores propiamente dichos debido a que no penetran en la célula, sino que ejercen su función crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular, pero no suelen usarse solos sino acompañados con los agentes crioprotectores penetrantes. Ejemplos de ellos son: Sacarosa, dextrosa, glucosa, polivinilpirrolidona (PVP), dextrano y polietilenglicol (Gao *et al.* 1995)

La adición del crioprotector va a depender de la permeabilidad y citotoxicidad de éste, se realiza a diferentes temperaturas. Pueden agregarse y extraerse en pasos, en otras palabras, aumentando o disminuyendo gradualmente la concentración de crioprotector en el medio, de esta manera se reduce el stress osmótico de la célula. Hay dos formas diferentes de añadir el crioprotector al medio. Por una parte, se agregan en distintos pasos, pero llegando a un volumen fijo. Por otra parte, esta adición varía en volumen para que así se produzcan cambios equilibrados en la molaridad del crioprotector, este proceso es conocido como fixed molar step (Gao *et al.* 1995; Gilmore *et al.* 1997).

La cantidad de agua osmóticamente inactiva de un espermatozoide corresponde al 45 – 75 por ciento, por lo que su deshidratación es mínima en comparación de otras células. Los espermatozoides humanos pueden disminuir solo un 75 por ciento de su volumen y mantener un 90 por ciento de su motilidad original aunque pueden hincharse solo un 11 por ciento de su volumen original. Entonces, los espermatozoides resisten más un encogimiento que una fuerte hinchazón, dado esto, surge la preocupación de que al eliminar el crioprotector después de la descongelación podría tener un efecto negativo sobre las tasas de supervivencia espermática (Gao *et al.* 1995).

Si se agrega el crioprotector en un solo paso, podría tener consecuencias como el obtener un aumento del volumen de los espermatozoides aproximado de 160 por ciento y la pérdida del 70 por ciento de la motilidad. Sin embargo, al utilizar la adición *fixer molar step*, el máximo aumento de un espermatozoide nunca superará el límite superior del volumen celular por lo que no tendrá ningún efecto negativo en la supervivencia espermática. Según Gilmore *et al.* (1997), la adición del crioprotector causa menos daño cuando se realiza gradualmente, para ello es necesario cuidar al máximo el tiempo que se emplea en la adición de los medios crioprotectores ya sea para su congelación o la adición del medio de cultivo para su descongelación.

2.8.3 BENEFICIOS

Los mecanismos por los que los crioprotectores actúan a favor de la supervivencia de los espermatozoides no son del todo conocidos, a pesar de que su uso es una práctica habitual. Se tiene conocimiento de los siguientes: Dilución de los electrolitos, los crioprotectores protegen las células de los efectos de los solutos, ya que diluyen la alta concentración de electrolitos, se sabe que, en un sistema con dos fases, agua líquida y hielo a determinada presión, la concentración de soluto en fase líquida es constante a cierta temperatura. El agua se solidifica a hielo por lo que la solución restante tendrá altas concentraciones de crioprotector y electrolitos de forma progresiva (Hammerstedt *et al.* 1990).

La disminución de la concentración del agua, evita la formación de hielo intracelular porque al agregar el crioprotector, es decir más moléculas, impide a los cristales de hielo en crecimiento encontrar fácilmente moléculas de agua y así seguir creciendo, de esta manera se reduce el riesgo de muerte celular. Aumento de la viscosidad, las sustancias crioprotectoras que ingresan al interior de las células producen un aumento de la viscosidad de ésta, por lo que se reduce la movilidad de las moléculas en el interior y así

se ve reducida también la formación de cristales de hielo, aumentando el porcentaje de supervivencia de las células sometidas al congelamiento (Hammerstedt *et al.* 1990).

Otro beneficio es el efecto coligativo, el cual se refiere a que el punto crioscópico de la solución se reduce al agregar un disolvente, el crioprotector, en consecuencia, se requiere de una temperatura más baja para que cambie de fase, por lo que las células percibirían menos estrés salino diferencia de si estuvieran sin crioprotector. Esto puede impedir la presencia de elevadas concentraciones de soluto en la porción que aún no ha congelado hasta que el sistema se enfría a temperaturas muy bajas en donde es inhibida la actividad molecular (Lovelock *et al.* 1954).

2.8.4 DESVENTAJAS

De la misma manera como los crioprotectores pueden ser beneficiosos para evitar un daño celular a su vez son muy dañinos cuando se excede en su concentración utilizada. Dentro de los principales daños son: Toxicidad, se sabe que los crioprotectores son sustancias químicas que no ingresan a la célula si se encuentran en condiciones normales, por esta razón cuando los crioprotectores ingresan a la célula y se difunden en todo el interior de la célula, en otras palabras, se está envenenando a la célula (Fuller y Paynter 2004). Sin embargo, esta acción tóxica se ve muy reducida ya que el metabolismo celular está ralentizado, con la excepción que se utilice elevadas concentraciones de crioprotector a una temperatura relativamente alta, alrededor de los 0° C.

Ósmosis, esta desventaja consiste en que el hecho de agregar crioprotector sobre las células, se ejerce un estrés osmótico en ellas lo que aumenta la osmolaridad del medio. Primero las células se van a deshidratar para compensar la fuerza osmótica generada por la presencia de los crioprotectores, luego se hidratan al mismo tiempo que el agua vuelve a ingresar a la célula junto con el crioprotector, en caso de ser crioprotector permeable. En el momento que el crioprotector permeable ingresa a la célula lo hace más lentamente que el agua debido principalmente a que la membrana presenta un mayor coeficiente de permeabilidad al agua que al crioprotector, produciéndose que las células retornen a su volumen isotónico normal.

En la descongelación, se elimina el crioprotector por dilución de la muestra, por el gradiente osmótico, el agua ingresa al interior de la célula de forma muy rápida por lo que el crioprotector sale de las células lentamente, de esta manera las células se hinchan antes de alcanzar el equilibrio. Cuando la célula se hincha y contrae, puede que ser muy grande,

generando daño irreversible en la célula, se conoce como “límite de tolerancia osmótica” cuando se producen estos daños, siendo únicos para cada tipo y especie celular Gilmore *et al.* (1995).

Otra desventaja es el cambio en la permeabilidad, ciertos crioprotectores disminuyen la permeabilidad al agua en distintos grados, de donde resulta que los espermatozoides se deshidratan más lentamente de lo que se espera. Existen dos vías por las que el agua fluye esta son, canales proteicos y por medio de la bicapa lipídica. Es así que el crioprotector podría afectar la permeabilidad de la membrana de tres maneras modificando la bicapa lipídica, causando cambio en su permeabilidad directamente; Segundo, modificando la bicapa lipídica, afectando indirectamente la actividad transportadora de las proteínas de membrana e interfiriendo indirectamente con la función de las proteínas transportadoras de agua, principalmente a los canales específicos para el transporte de agua o también a los canales que transportan otras moléculas como glucosa, que a su vez suelen facilitar en transporte de agua (Fernandez *et al.* 2009).

2.8.5 COMPONENTES

Existen diversas sustancias que son capaces de cambiar la composición lipídica de la membrana celular mejorando su fluidez. Tiene importancia dado que la transición de fase de membrana lipídica está asociada con el shock por frío, ya que éste produce la separación de las fases y, por tanto pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana celular (Fernandez *et al.* 2009). La lecitina (origen de aceite de soja) o yema de huevo (contiene lecitina y fosfolípidos), brindan protección ante el shock por frío a la membrana plasmática.

Actualmente se desconoce el mecanismo por el que estas sustancias protegen a las células del shock por frío. Se asocia esta protección al efecto de la yema de huevo, que contiene una lipoproteína de baja densidad (LDL), que es posible que se una a la membrana de forma directa y así modifica su permeabilidad o activando enzimas de la membrana, tales como adenilato ciclasa, bombas iónicas, etc, estas enzimas posiblemente ayuden a mejorar la respuesta a crioprotectores permeables y el comportamiento osmótico. A su vez, la adición de algún detergente al medio crioprotector como SDS, tiene un posible efecto beneficioso, al ser un detergente modifica las partículas de la yema de huevo (LDL), de esta manera solubiliza lípidos, facilitando la interacción entre LDL y la membrana plasmática.

La albúmina es otro de los componentes importantes en el medio crioprotector, varios investigadores han coincidido y proporcionado evidencia de que la albúmina se adhiere directamente a la membrana plasmática del espermatozoide en el momento de diluir el semen con el medio crioprotector, su modo de acción es el siguiente, modifica la composición lipídica del espermatozoide por medio de hidrólisis o intercambio lipídico, promueve la hidrólisis de las proteínas de la membrana plasmática, genera la entrada de iones de calcio al citoplasma, reduce el colesterol y la cantidad de fosfolípidos presentes en la membrana plasmática del espermatozoide. La reducción del colesterol produce una fluidez de membrana mayor, en consecuencia, resistencia a la congelación (Fernandez *et al.* 2009).

Existen otras sustancias que permiten la extracción del colesterol de las membranas, las cuales presentan propiedades lipofílicas, como el metil-beta-ciclodextrina, un derivado de un oligómero cíclico de la glucosa. Estas sustancias han demostrado mejorar la supervivencia de los espermatozoides a la congelación. Se añade EDTA y citrato al medio crioprotector, puesto que durante un proceso de congelación se genera un descontrol de la concentración de calcio intracelular, estos componentes se encargarían de atrapar el calcio, en el caso de EDTA atrapa también otros iones metálicos y es posible que inhiba la peroxidación de lípidos, de esta manera EDTA y citrato disminuirían la gradiente de concentración en toda la membrana plasmática del espermatozoide. En el medio extracelular la concentración de calcio es cuatro veces mayor que en el interior de la célula (0.1 mM).

Se ha asociado la función defectuosa de los espermatozoides después de la congelación, a la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática. Se han descrito diferentes componentes que evitan la peroxidación de lípidos durante la congelación, estos son: Ditiotreitól, glutatión y butirato hidroxitolueno, los cuales han presentado mejoras en la motilidad e integridad acrosomal después de la descongelación. Se han realizado muchos intentos para evitar la peroxidación en el semen, entre ellos tenemos, el de realizar el proceso en condiciones anaeróbicas, uso de antioxidantes y adición de sustancias quelantes. Sin embargo, aún no se ha confirmado la eficacia de estas estrategias.

Algunas formulaciones que contienen alto contenido de azúcar no tienen un buffer de pH, sin embargo, componentes como la yema de huevo puede afectar el pH total de la solución. Diferentes medios crioprotectores contienen citrato de sodio, TRIS (trifosfato hidroximetil aminometano), buffers zwitterionicos tal como TES (N-trifosfato-

hidroximetil-metil-2-aminoetanosulponico ácido). No se recomienda utilizar PBS (Tampón fosfato salino) como buffer para la congelación de espermatozoides, debido a que contiene altas concentraciones de sodio, y puede llegar a ser perjudicial para los espermatozoides ya que se alteran las bombas de Na – K, y podría generar que el interior de las células alcance niveles tóxicos de éstos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio PRANOR, de la Clínica Concebir sede San Isidro, Lima, Perú.

3.2 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA SEMINAL

Se evaluaron un total de 300 muestras seminales de pacientes normozoospermicos según OMS (2010). El paciente ingresó al área de Toma de Muestra en el que se le dieron indicaciones (Ver Anexo 3).

3.3 EVALUACIÓN DE LA MUESTRA SEMINAL

Se dejó licuar la muestra por un tiempo no menor a 20 minutos. Se llevó la muestra a la cámara de flujo, con una pipeta de vidrio se extrajo una gota y colocó en la cámara Makler, para realizar un espermograma. Se evaluó parámetros macroscópicos (volumen, ph, consistencia) y microscópicos (concentración espermática, motilidad "0, I, II, III", debris, aglutinación, células redondas, viabilidad y morfología). Siendo la concentración espermática y motilidad progresiva los parámetros excluyentes para considerar una muestra seminal.

3.4 SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS SEMINALES

Se evaluaron 300 muestras seminales en el periodo de setiembre de 2017 a marzo de 2018, se seleccionó un total de 100 muestras seminales que son consideradas como normales según OMS (2010) de varones de edades entre 22 y 35 años, que cumplieron con las siguientes características: Apariencia (Gris Opalescente), Consistencia (No Viscosa), Volumen ($\geq 1.5\text{mL}$), pH (≥ 7.2), Concentración espermática ($\geq 15\ 000\ 000/\text{mL}$), Motilidad Progresiva (≥ 32 por ciento), Viabilidad (≥ 58 por ciento), Morfología (≥ 4 por ciento) y presencia de otras células ($\leq 1\ 000\ 000/\text{mL}$)

3.4.1 TRATAMIENTOS DE CONGELACIÓN

Se utilizaron 25 muestras seminales con un volumen ≥ 2 mL. Se anotó la concentración espermática y motilidad progresiva después de descongelar los crioviales.

- CONGELACIÓN

Se mezcló con 2 mL de crioprotector y fue distribuido en fracciones de 1 mL en cuatro crioviales rotulados (I, II, III, IV), que indican el tratamiento de congelación utilizado.

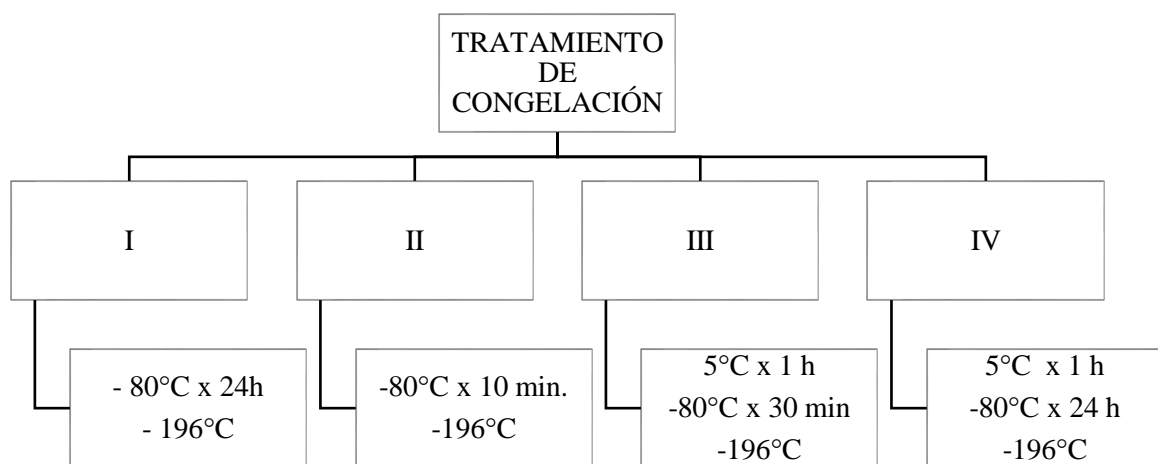


Figura 1: Diagrama de flujo de los cuatro tratamientos de congelación.

Tratamiento I

El criovial fue dejado en el tanque de vapores de nitrógeno, sometido a una temperatura de -80°C, y se dejó por 24 horas. Pasadas las 24 horas, se llevó al tanque de nitrógeno líquido, a una temperatura de -196°C, por un periodo no menor a 2 días.

Tratamiento II

El criovial fue dejado en el tanque de vapores de nitrógeno, sometido a una temperatura de -80°C, y se dejó por 10 minutos. Pasados los 10 minutos, se llevó al tanque de nitrógeno líquido, a una temperatura de -196°C, por un periodo no menor a 2 días.

Tratamiento III

El criovial se dejó en una refrigeradora, sometido a una temperatura de 5°C por una hora. Luego fue llevado al tanque de vapores de nitrógeno, sometido a una temperatura de -

80°C, y se dejó por 30 minutos. Pasados los 30 minutos, fue llevado al tanque de nitrógeno líquido, a una temperatura de -196°C, por un periodo no menor a 2 días.

Tratamiento IV

El criovial se dejó en una refrigeradora, sometido a una temperatura de 5°C por una hora. Luego fue llevado al tanque de vapores de nitrógeno, sometido a una temperatura de -80°C, y se dejó por 24 horas. Pasadas las 24 horas, se llevó al tanque de nitrógeno líquido, a una temperatura de -196°C, por un periodo no menor a 2 días.

- DESCONGELACIÓN

Los 4 crioviales fueron retirados del tanque de nitrógeno líquido, y se procedió a su descongelación. Primero a temperatura ambiente (21°C) por 5 minutos, luego a la estufa 35°C por 10 minutos.

- GRADIENTE DE DENSIDADES

Todo el procedimiento se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar, por cada uno de los crioviales (I, II, III, IV). El proceso de gradiente de densidades se detalla en el Anexo III.

3.4.2 TRATAMIENTOS DE DESCONGELACIÓN

Se utilizaron 25 muestras seminales con un volumen ≥ 1.0 mL, que fueron distribuidos en dos fracciones (I, II). Se anotó la concentración espermática y motilidad progresiva después de descongelar los crioviales.

- CONGELACIÓN

Se congeló la muestra seminal según el tratamiento de congelación óptimo que se obtuvo previamente.

- DESCONGELACIÓN



Figura 2: Diagrama de flujo de los dos tratamientos de descongelación.

Tratamiento I

El criovial se retiró del tanque de nitrógeno líquido y fue llevado a la cámara de flujo laminar a temperatura ambiente (21°C) por 10 minutos. Pasados los 10 minutos, se llevó a la estufa (35°C) por 20 minutos.

Tratamiento II

El criovial se retiró del tanque de nitrógeno líquido y se llevó a la cámara de flujo laminar a temperatura ambiente (21°C) por 5 minutos. Pasados los 5 minutos, se llevó a la estufa (35°C) por 10 minutos.

- GRADIENTE DE DENSIDADES

Todo el procedimiento se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar, por cada uno de los crioviales (I, II). El proceso de gradiente de densidades se detalla en el Anexo IV.

3.4.3 TRATAMIENTOS POST DESCONGELACIÓN

Se utilizaron 25 muestras seminales con un volumen ≥ 1.5 ml, que fueron distribuidos en tres fracciones (I, II, III). Se anotó la concentración espermática y motilidad progresiva después de descongelar los crioviales.

- CONGELACIÓN

Se congeló la muestra seminal según el tratamiento de congelación óptimo que se obtuvo previamente. En el caso del tratamiento I, se realizó la congelación directa del plasma seminal con el crioprotector. Por otra parte, en el caso de los tratamientos II y III, se realizó una capacitación espermática por gradientes de densidad previa a su congelación, posteriormente a la descongelación, en el tratamiento II se realizó un gradiente de densidades, mientras que en el tratamiento III, se realizó un lavado.

- DESCONGELACIÓN

Los tres crioviales se retiraron del tanque de nitrógeno líquido y se realizó el tratamiento de descongelación óptimo que se obtuvo previamente.

- **GRADIENTES DE DENSIDAD**

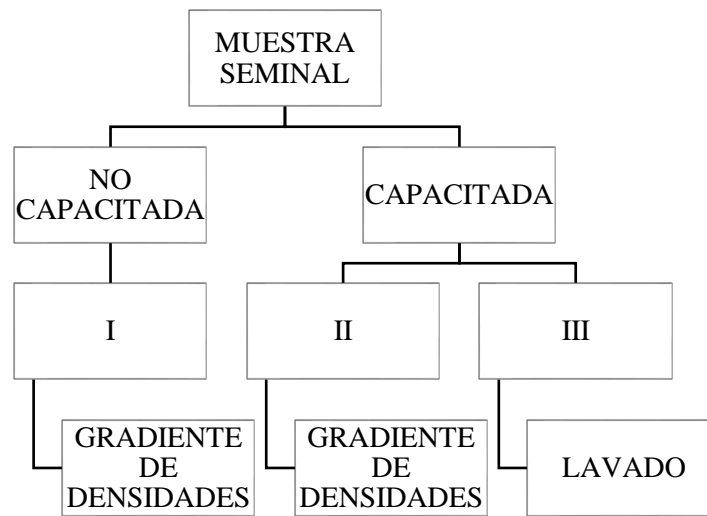


Figura 3: Diagrama de flujo de los tres tratamientos post descongelación.

Tratamiento I: Control

Todo el procedimiento se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar. El proceso de capacitación por gradientes de densidad se detalla en el Anexo VII.

Tratamiento II: Gradiente de Densidades

Todo el procedimiento se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar. El proceso de capacitación por gradiente de densidades se detalla en el Anexo VII.

Tratamiento III: Lavado

Todo el procedimiento se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar. En este caso sólo se realizó un lavado con Sperm Washing luego de descongelar el criovial.

3.4.4 MEDIO DE CULTIVO, CRIOPROTECTOR Y METODOLOGÍA

Se utilizaron 25 muestras seminales con un volumen ≥ 2.4 mL, que fueron distribuidos en tres fracciones.

- CONGELACIÓN

Se colocó cada fracción de 0.8 mL en un tubo cónico, teniendo un total de 3 tubos rotulados: NC (No Capacitado), IS (Capacitado Irvine Scientific®), LG (Capacitado LifeGlobal Group®), que indicaron el tratamiento previo a la congelación.

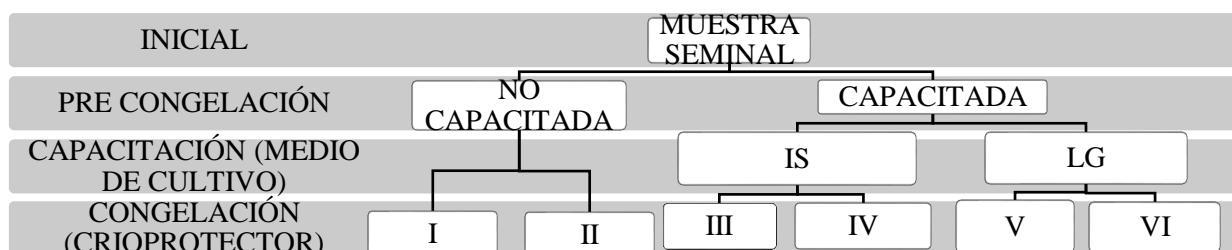


Figura 4: Diagrama de flujo de los seis tratamientos de congelación utilizando dos medios de cultivo, dos crioprotectores y dos metodologías.

PRIMERA FRACCIÓN (NC)

Se distribuyó en dos tubos cónicos, cada uno con 0.4 mL de muestra seminal, luego se agregó el crioprotector a cada uno de los tubos en proporción 1:1 y 1:0.7 de muestra y crioprotector, según el inserto de Irvine Scientific® y LifeGlobal Group® respectivamente. Finalmente se tuvo dos crioviales rotulados: 1 y 2 (crioprotector IS) y (crioprotector LG) respectivamente, y se prosiguió con el tratamiento de congelación óptimo que se obtuvo previamente.

SEGUNDA FRACCIÓN (IS)

Se realizó una capacitación espermática por gradientes de densidad, se distribuyó en dos tubos cónicos, cada uno con 0.4 mL de muestra capacitada, se le agregó el crioprotector en proporción 1:1 y 1:0.7 de muestra y crioprotector, según el inserto de Irvine Scientific® y LifeGlobal Group® respectivamente. Esta adición se realizó paulatinamente de 0.1 mL a 0.1 mL hasta completar el volumen respectivo, considerando que por cada adición se homogenizó la mezcla. Finalmente se tendrán dos crioviales rotulados: 3 y 4, (crioprotector IS) y (crioprotector LG) respectivamente, y se continuó con el tratamiento de congelación óptimo que se obtuvo previamente.

TERCERA FRACCIÓN (LG)

Se realizó una capacitación espermática por gradiente de densidades con el medio de cultivo LifeGlobal Group®, se distribuyó en dos tubos cónicos, cada uno con 0.4 mL de muestra capacitada, se le agregó el crioprotector en proporción 1:1 y 1:0.7 de muestra y crioprotector, según el inserto de Irvine Scientific® y LifeGlobal Group® respectivamente. Finalmente se obtuvieron dos crioviales rotulados: 5 y 6, (crioprotector IS) y (crioprotector LG) respectivamente, y se prosiguió con el tratamiento de congelación óptimo que se obtuvo previamente.

- DESCONGELACIÓN

Todos los crioviales (I, II, III, IV, V, VI) fueron retirados del tanque de nitrógeno líquido y se prosiguió con el tratamiento de descongelación óptimo que se obtuvo previamente.

- POST DESCONGELACIÓN

Todos los crioviales (I, II, III, IV, V, VI) fueron sometidos al mismo tratamiento post descongelación óptimo que se obtuvo previamente.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó muestras seminales de pacientes normozoospermicos de los laboratorios PRANOR, Grupo de Reproducción Asistida, manteniendo el anonimato de ellos. Los datos obtenidos fueron llevados al programa Excel que posteriormente fueron evaluados por el programa SPSS 25. Los datos fueron presentados como media \pm DE. Las variables son independientes e idénticamente distribuidas y se comprobó que corresponden a una distribución normal en la población. Para ello fue empleada la prueba paired T test para comparar la eficiencia en la recuperación de espermatozoides móviles progresivos de los tratamientos de congelación, descongelación, post descongelación, además del medio de cultivo, crioprotector y metodología. Para todo análisis estadístico, fue considerado significativo si el valor de $P < 0.05$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se seleccionaron un total de 25 muestras seminales para cada evaluación (Congelación, descongelación, post descongelación y por último, medio de cultivo, crioprotector y metodología), de varones de edades entre 22 y 35 años, las cuales cumplieron con los parámetros normales establecidos por la OMS (2010). La descripción de las muestras estudiadas y la evaluación de los parámetros espermáticos se observa en la Tabla 5 (Anexo 9).

4.1 COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS DE CONGELACIÓN

El volumen de semen fue en promedio de 2.46 ± 0.39 mL. En el caso de las variables de concentración espermática y motilidad progresiva inicial fue en promedio 73.21 ± 23.91 millones/mL y 49 ± 9.96 por ciento, respectivamente. Sin embargo, se observa que la concentración espermática final, luego de pasar por los cuatro tratamientos muestran diferencias significativas entre ellos. Siendo el tratamiento I el que obtiene una mayor concentración de espermatozoides móviles progresivos por mL (21.19 ± 13.91) después de descongelar las muestras seminales (Tabla 1). Por otro lado, el tratamiento con el que se obtuvo una menor concentración de espermatozoides móviles progresivos por mL fue el tratamiento IV (15.19 ± 11.09). El tratamiento I tiene una variación de la muestra seminal inicial y final de 43.3 por ciento, es decir una eficiencia en la recuperación de espermatozoides móviles progresivos por mL de 56.7 por ciento. Por otro lado, en el tratamiento IV, se tiene una variación de 59.3 por ciento, presentando una baja eficiencia de recuperación de 40.7 por ciento.

Tabla 1: Valores seminales después de la descongelación.

FINAL	
TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN E.M.P (millones/mL)
I	21.19 ± 13.91 a
II	16.03 ± 9.81 b
III	16.22 ± 10.19 b
IV	15.19 ± 11.09 b

Los valores muestran medias ± desviación estándar. Se utilizaron cuatro tratamientos para la congelación de semen humano. E.M.P (Espermatozoides móviles progresivos) ^{a,b}, P<0.05.

La congelación de semen humano es un proceso que, cada vez toma mayor importancia en los centros de reproducción asistida. Diferentes estudios han mostrado que las metodologías en la congelación espermática varían, donde se obtiene una pobre recuperación de espermatozoides móviles progresivos al descongelar las muestras, además se generan daños en el material genético. La formación de especies reactivas de oxígeno sería la causa principal de la disminución de la baja recuperación de espermatozoides móviles progresivos, debido a que causan daño en la cromatina y ADN lo que concuerda Aitken *et al.* (1994), desencadenando en el principal problema, que los espermatozoides con material genético dañado también pueden fecundar un óvulo y según Twigg *et al.* (1871) también son capaces de generar pronúcleos siendo el desarrollo de dicho embrión inadecuado.

Durante la congelación, la transición de fase no ocurre a la vez en todos sus fosfolípidos de membrana, dada esta razón existe una alta posibilidad de la coexistencia entre estado fluido y gel durante esta transición, generando defectos en el empaquetamiento de las membranas, por lo que hay una mayor permeabilidad de solutos, produciéndose pérdida de solutos del interior de la célula. Por esta razón este estudio optó por evaluar diferentes tratamientos de congelación, en los que varía el tiempo de exposición a diferentes temperaturas, donde se observó que, la concentración de espermatozoides móviles progresivos por mL mostró ser mayor utilizando el tratamiento I, donde se obtuvo 21.19 ± 13.91 (sólo presentó una variación entre la muestra inicial y final de 43.28 por ciento). Sin embargo, en el tratamiento II, III y IV fue similar, presentando una variación (57.09,

56.58 y 59.34 por ciento, respectivamente). Finalmente se corroboró la eficiencia del tratamiento I (56.72 por ciento). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Brugh *et al.* (2003) indicaron que, durante la congelación ocurre ruptura de membrana, debido a la formación de cristales de hielo intracelulares durante el enfriamiento rápido, como lo fue el caso del tratamiento II y III, además, se observa que en el caso del tratamiento I, donde se llevó a cabo enfriamiento lento, no fue tan dañino a diferencia del tratamiento IV, que también fue por enfriamiento lento, sin embargo, las 3 temperaturas a las que fue sometido, puede haber generado la baja recuperación de E.M.P. Se sabe que, someter a los espermatozoides al enfriamiento lento, también resulta perjudicial para la supervivencia de los espermatozoides, dado que este produce efectos mecánicos de la fuerza del hielo extracelular, que fue en el caso de los tratamientos I y IV. Lo anterior concuerda con lo demostrado por Mossad *et al.* (1994), quienes determinaron que en los espermatozoides humanos se produce un daño extenso en su membrana durante su congelación. De la misma manera, coinciden con Morris *et al.* (1999), quienes demostraron que los espermatozoides humanos poseen una curva de respuesta muy amplia con poca diferencia en la viabilidad, por tanto, es común que sólo se recupere menos del 60 por ciento de los espermatozoides congelados. Además, no existe alguna característica del semen fresco que pueda predecir la capacidad para sobrevivir a la congelación y descongelación (Mossad *et al.* 1994).

Es importante la temperatura en la que da inicio a la formación de hielo (punto de nucleación), ya que si esta temperatura es demasiado baja, aumenta de manera explosiva el crecimiento de los cristales de hielo en el interior de las células, en consecuencia, estos atraviesan a las células generando su muerte, menciona Mazur (1977). Sin embargo, Fuller y Paynter (2004), explican que no existen protocolos que puedan inducir la nucleación, y puede deberse a que la matriz intracelular del espermatozoide humano es altamente viscosa por su alto contenido de proteínas y azúcares. Por lo tanto, según lo obtenido en este estudio, es posible que sea necesario que los espermatozoides pasen por un tiempo prolongado por cada cambio de temperatura.

El enfriamiento lento y rápido resultan perjudiciales para los espermatozoides, ya que generan diferentes daños a la membrana plasmática, sin embargo, el efecto mecánico del hielo extracelular es menos perjudicial para la célula en comparación con el daño que se genera con el enfriamiento lento con la formación de hielo intracelular. Por esta razón, el tratamiento I obtuvo una mayor recuperación de E.M.P, además de brindar un tiempo mayor por cada cambio de temperatura (24h) a diferencia del tratamiento II (10 min), y

tener sólo dos cambios de temperatura (-80°C y -196°C) a diferencia del tratamiento IV (5°C, -80°C y -196°C).

4.2 COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS DE DESCONGELACIÓN

El volumen de semen fue en promedio de 2.31 ± 0.58 mL. En el caso de las variables de concentración espermática y motilidad progresiva inicial fue en promedio 51.84 ± 24.17 millones/mL y 35.4 ± 10.05 por ciento, respectivamente. El tratamiento I es el que obtiene una mayor concentración de espermatozoides móviles progresivos por mL (11.69 ± 7.80) después de descongelar las muestras seminales (Tabla 2). El tratamiento I tiene una variación de la muestra seminal inicial y final de 37.92 por ciento, es decir una eficiencia en la recuperación de espermatozoides móviles progresivos por mL de 62.08 por ciento. Por otro lado, en el tratamiento II, tiene una variación de 63.73 por ciento, presentando una baja eficiencia de recuperación de 36.27 por ciento.

Tabla 2: Valores seminales después de la descongelación.

FINAL	
TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN E.M.P (millones/mL)
I	11.69 ± 7.80 a
II	6.83 ± 4.11 b

Los valores muestran medias \pm desviación estándar. Se utilizaron dos tratamientos para la descongelación de semen humano. E.M.P (Espermatozoides móviles progresivos). ^{a, b}, $P < 0.05$.

El proceso de congelar y descongelar muestras seminales aumenta significativamente el porcentaje de variación de espermatozoides móviles progresivos de la muestra inicial y final (después de descongelar) en muestras seminales de buena calidad. En el presente estudio, los tratamientos propuestos para descongelar semen de pacientes normozoospermicos mostraron diferencia significativa sobre la recuperación espermática. Se detectó que el proceso de congelar y descongelar reduce la concentración de espermatozoides móviles progresivos en un 37.92 por ciento con respecto a lo obtenido por el tratamiento I.

La concentración de espermatozoides móviles progresivos mostró ser mayor utilizando el tratamiento I, donde se obtuvo de concentración 11.69 ± 7.80 millones/mL (sólo presentó una variación entre la muestra inicial y final de 37.92 por ciento). Sin embargo, en el tratamiento II, fue muy reducida la recuperación espermática 6.83 ± 4.11 millones/mL, presentando una variación 63.73 por ciento. Finalmente se corroboró la eficiencia del tratamiento I y II (62.08 y 36.27 por ciento, respectivamente).

Los valores de recuperación de espermatozoides móviles progresivos después de la descongelación en las muestras seminales estudiadas resultaron similares a lo detectado en la investigación de Hammadeh *et al.* (2001), en donde se concluyó que, el proceso de congelación y descongelación afecta en la recuperación espermática y que, el proceso de descongelación óptimo de muestras seminales debe reducir el desequilibrio osmótico y la recristalización de microcristales de agua intracelular que pueden dañar las estructuras celulares (Caballero *et al.* 1995).

Según Fuller y Paynter (2004), la descongelación va a generar la formación de hielo intracelular, es decir recristalización, disminución de la concentración extracelular de solutos y toxicidad del crioprotector, generando daño estructural e hinchazón de los espermatozoides. Para ello recomiendan optar por una tasa de descongelación rápida y así disminuir el tiempo de exposición al crioprotector, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos, debido a que el tratamiento I, mantiene el criovial por 10 minutos a temperatura ambiente (21°C), para luego dejarlo por 20 minutos a 35°C. Dejar los espermatozoides congelados por sólo 5 minutos a temperatura ambiente, y luego dejarlo por 10 minutos a 35°C, como el tratamiento II, ha mostrado una baja recuperación de espermatozoides móviles progresivos, mostrando una baja eficiencia de 36.27 por ciento. Calamera *et al.* (2010) mostraron que, la descongelación rápida a 45°C resulta más eficiente, sin embargo, para ello se requiere de equipos específicos que ayuden a controlar y mantener las temperaturas por tiempos mínimos, para que así no se exponga por mucho tiempo el crioprotector a los espermatozoides. No obstante, obtener una eficiencia en la recuperación espermática de 62.08 por ciento está dentro del rango normal común en las diversas investigaciones. Por otro lado, Morris *et al.* (1999), aseguran que la recuperación de espermatozoides móviles progresivos no está correlacionado con las teorías convencionales de la lesión por descongelación celular, sino que son otros los factores que determinan la viabilidad después de la congelación y descongelación. De la misma manera Rall *et al.* (1980), explican que los cambios osmóticos se generan al inverso de la

congelación, donde la concentración de solutos en el medio extracelular se reduce rápidamente, la célula logra hidratarse y así equilibra la diferencia de concentraciones entre el medio extra e intracelular, es por ello que se atribuyó la importancia de la descongelación rápida, dado que, podría evitar el crecimiento de los cristales de hielo, caso contrario de una descongelación lenta, donde se da lugar al crecimiento de los cristales de hielo presentes en el interior de las células. La cantidad de agua osmóticamente inactiva de un espermatozoide corresponde de 45 a 75 por ciento, gracias a ello, su nivel de deshidratación es mínima en comparación de otras células (Gao *et al.* 1995), por lo que, los espermatozoides, máximo pueden hincharse un 11 por ciento de su volumen original, por eso pueden resistir en mayor medida un encogimiento que una fuerte hinchazón, y esto puede ser consecuencia de eliminar el crioprotector después de la descongelación teniendo un efecto negativo en la recuperación espermática.

Los resultados de este estudio indican que los tratamientos de descongelación evaluados afectan de manera diferente la supervivencia de los espermatozoides, coincidiendo con lo indicado por Henry *et al.* (1993) muestran que, cuando una muestra seminal normozoospermica se enfría a una velocidad lenta, la función mitocondrial de los espermatozoides, que es una variable asociada con la supervivencia de éstos, resulta mayor si la velocidad de descongelación de la muestra seminal también es lenta. Mientras que, si la velocidad de enfriamiento es alta y la de calentamiento alta, se obtiene un mayor porcentaje de espermatozoides con función mitocondrial con respecto a una velocidad de calentamiento baja. Por tanto, conviene realizar un tratamiento de congelación lenta (Tratamiento I) y descongelación lenta (Tratamiento I), para que así se obtenga una mayor función mitocondrial que conlleva a una mayor tasa de sobrevivencia de espermatozoides después de su descongelación.

4.3 COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS POST DESCONGELACIÓN

El volumen de semen fue en promedio de 2.56 ± 0.68 mL. En el caso de las variables de concentración espermática y motilidad progresiva inicial fue en promedio 79.08 ± 15.70 millones/mL y 56.76 ± 15.10 por ciento, respectivamente. Sin embargo, en la Tabla 3, se observan los resultados de capacitar la muestra seminal para los tratamientos II (gradiente de densidades) y III (lavado). La concentración espermática y motilidad progresiva al capacitar fue en promedio 56.68 ± 19.24 millones/mL y 97.72 ± 1.34 por ciento, respectivamente. La concentración espermática por mL y motilidad progresiva final, no

presentó diferencias significativas entre ellos (Tabla 3.1). No existen diferencias significativas en la variación y eficiencia porcentual entre los tratamientos post descongelación.

Tabla 3: Comparación tratamientos post descongelación. Antes y después de la capacitación espermática.

INICIAL		
CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA (millones/mL)	MÓTILIDAD PROGRESIVA (%)	E.M.P (millones/mL)
79.08 ± 15.70	56.76 ± 15.10	46.59 ± 17.99
CAPACITACIÓN		
56.68 ± 19.24	97.72 ± 1.34	55.39 ± 18.75

Los valores muestran medias ± desviación estándar. Se utilizaron 25 muestras seminales. E.M.P (Espermatozoides móviles progresivos).

Tabla 3.1: Valores seminales después de la descongelación.

FINAL	
TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN E.M.P (millones/mL)
I	15.09 ± 12.51 a
II	16.38 ± 13.26 a
III	12.85 ± 12.13 a

Los valores muestran medias ± desviación estándar. Se utilizaron tres tratamientos post descongelación de semen humano. E.M.P (Espermatozoides móviles progresivos). ^{a, b}, P<0.05. No existen diferencias significativas entre los tratamientos.

El tratamiento de espermatozoides después de descongelarlos es un paso importante, es por ello que se consideró una de las variables en este estudio, donde se comparó la eficiencia de realizar gradiente de densidades y el lavado de la muestra descongelada. Según Malvezzi *et al.* (2014) la centrifugación en gradiente de densidades separa las

células espermáticas en función de su densidad, dado que los espermatozoides morfológicamente normales y anormales tienen diferentes densidades. Además, Beydola *et al.* (2013) explican que, un espermatozoide maduro morfológicamente normal tiene una densidad ligeramente mayor de 1.10 g / mL, mientras que un espermatozoide inmaduro y morfológicamente anormal tiene una densidad menor entre 1.06 y 1.09 g / mL. Al final de la centrifugación, cada espermatozoide se encuentra en el nivel de gradiente que coincide con su densidad y los espermatozoides viables, muy móviles, morfológicamente normales, forman un sedimento en la parte inferior del tubo (Allamaneni *et al.* 2005).

Aunque la preparación de la muestra seminal se puede lograr usando varias técnicas como el lavado y la gradiente de densidades, diferentes autores muestran que la gradiente de densidades produce de forma consistente muestras de la más alta calidad requerida para la inseminación intrauterina y para FIV, lo que coincide con los resultados obtenidos (Beydola *et al.* (2013); Jayaraman *et al.* (2012); Enciso *et al.* (2011)). A pesar de que existe una diferencia entre ambos tratamientos, esta diferencia no alcanza a ser significativa estadísticamente. Se observa que en el tratamiento II (gradiente de densidades) se obtuvo una concentración espermática de 16.38 ± 13.26 millones/mL y para el tratamiento III (lavado), presentó una recuperación espermática de 12.85 ± 12.13 millones/mL. Finalmente se corroboró la eficiencia del tratamiento II y III (29.6 y 25 por ciento, respectivamente).

El tratamiento III (lavado) no influyó significativamente sobre la recuperación de espermatozoides móviles progresivos, puesto que se obtuvo una variación de la muestra inicial y final de 75 por ciento. Por lo que el proceso de congelación-descongelación tiene un mayor efecto deletéreo sobre los espermatozoides que el proceso de lavado post descongelación. Lo obtenido en este estudio concuerda con la investigación de Donnelly *et al.* (2001) donde se observaron reducción en la motilidad progresiva de los espermatozoides en un 77 por ciento después de descongelarlos.

De manera similar a lo obtenido en el tratamiento III, en el proceso de lavado, afecta la motilidad de los espermatozoides, sin que este efecto fuera de mayor magnitud al ejercido por el proceso de descongelación. Según Wooley *et al.* (1978), el proceso de gradiente de densidades y lavado implica someter a los espermatozoides a la dilución en medios de cultivo, seguido de la centrifugación y resuspensión. Esta dilución se realiza con un gran volumen de medio de lavado y la centrifugación tiene como fin concentrar una población de espermatozoides previamente diluida. Una consecuencia de ello, es el daño en la

integridad de la membrana plasmática y en la función mitocondrial, lo que trae consigo una reducción de la motilidad de los espermatozoides. En Zhu *et al.* (2000) demostraron que el proceso de lavado redujo en un 26 por ciento, la presencia de espermatozoides con una morfología de la cola normal. Esto sugiere que los efectos negativos del lavado de una muestra seminal descongelada no solo son evidentes en la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, sino también en la alteración de la morfología de la cola, la cual resulta determinante para la calidad del movimiento del espermatozoide. Por lo tanto, al no existir diferencias significativas en los tratamientos post descongelación evaluados, no influyen en las variables estudiadas, es indiferente si se realiza gradiente de densidades o sólo lavado después de descongelar las muestras seminales. Sin embargo, se debe resaltar que se observó una reducción en la motilidad en las muestras seminales que sólo se realizó lavado.

4.4 COMPARACIÓN DE DOS MARCAS COMERCIALES DE MEDIO DE CULTIVO Y CRIOPROTECTOR (IRVINE SCIENTIFIC® Y LIFEGLOBAL GROUP®) Y METODOLOGÍA (CON Y SIN PLASMA SEMINAL)

El volumen de semen fue en promedio de 2.79 ± 0.46 mL. En el caso de las variables de concentración espermática y motilidad progresiva inicial fue en promedio 68 ± 27.27 millones/mL y 34.8 ± 12.78 por ciento, respectivamente. Sin embargo, en la Tabla 4, se observa los resultados de capacitar la muestra seminal para los tratamientos III, IV, V y VI. La concentración espermática y motilidad progresiva al capacitar con el medio de cultivo Irvine Scientific® fue en promedio 38.4 ± 15.04 millones/mL con motilidad progresiva en promedio 90.6 ± 1.02 por ciento, y con el medio de cultivo LifeGlobal GROUP® fue en promedio 35.2 ± 12.48 con motilidad progresiva 90.2 ± 0.4 (Tabla 4). En la tabla 4.1, se observa la comparación del uso de dos crioprotectores, utilizando dos medios de cultivo, se encontró diferencias significativas entre ambos crioprotectores sólo en el caso de utilizar el medio de cultivo LifeGlobal GROUP®. Por otro lado, no se encontró diferencias significativas entre ambos crioprotectores utilizando el medio de cultivo Irvine Scientific®. La concentración espermática por mL y motilidad progresiva final, presentó diferencias significativas en todos los tratamientos (Tabla 4.2). En el tratamiento I se observa una menor variación de 48.24 por ciento, entre la muestra inicial y final, teniendo una eficiencia de 51.76 por ciento en la recuperación de espermatozoides móviles progresivos después de la descongelación. Por otro lado, el tratamiento VI,

presenta la menor recuperación de E.M.P, con una variación entre muestra inicial y final de 93.03 por ciento, por tanto, una baja eficiencia de 6.97 por ciento.

Tabla 4: Comparación de medios de cultivo. Valores seminales, luego de la capacitación espermática con el medio de cultivo Irvine Scientific® y LifeGlobal GROUP®, previo a la congelación.

CAPACITACIÓN ANTES DE LA CONGELACIÓN			
MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA (millones/mL)	MÓTILIDAD PROGRESIVA (%)	E.M.P (millones/mL)
Irvine Scientific®	38.4 ± 15.04	90.6 ± 1.02	34.79 ± 16.40 a
LifeGlobal GROUP®	35.2 ± 12.48	90.2 ± 0.4	31.75 ± 13.35 b

Los valores muestran medias ± desviación estándar. Se utilizaron 25 muestras seminales. E.M.P (Espermatozoides móviles progresivos). ^{a,b}, P<0.05.

Tabla 4.1: Comparación de crioprotectores, utilizando diferentes medios de cultivo. Los valores muestran medias \pm desviación estándar.

CONCENTRACIÓN DE E.M.P (millones/mL)		CONCENTRACIÓN DE E.M.P (millones/mL)	
CRIOPROTECTOR	MEDIO DE CULTIVO Irvine Scientific®	CRIOPROTECTOR	MEDIO DE CULTIVO LifeGlobal GROUP®
Irvine Scientific®	9.64 \pm 5.31 a	Irvine Scientific®	5.22 \pm 3.52 b
LifeGlobal GROUP®	7 \pm 4.09 a	LifeGlobal GROUP®	1.66 \pm 1.01 c

Los valores muestran medias \pm desviación estándar. E.M.P (Espermatozoides móviles progresivos). ^{a, b, c}, P<0.05.

Tabla 4.2: Comparación de los seis tratamientos (Medio de cultivo, crioprotector y metodología).

FINAL	
TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN E.M.P (millones/mL)
I	12.32 \pm 6.21 a
II	5.92 \pm 2.84 b
III	9.64 \pm 5.31 c
IV	7.0 \pm 4.09 b,c
V	5.22 \pm 3.52 b
VI	1.66 \pm 1.01 d

Los valores muestran medias \pm desviación estándar. Utilizando seis tratamientos diferentes (medio de cultivo, crioprotector y metodología) para la congelación de semen humano. ^{a,b,c,d}, P<0.05.

- MEDIO DE CULTIVO

La función principal del plasma seminal es la de proteger a los espermatozoides de condiciones estresantes como, el estrés oxidativo (Saleh *et al.* 2002), a pesar de ello es necesario la preparación de la muestra seminal, debido a que está compuesto de espermatozoides senescentes, leucocitos, células epiteliales, residuos de partículas y además, presenta factores que inhiben la fertilización (Mortimer (2000); Rogers *et al.* (1983)). Es por esto que se requiere de la utilización de una técnica ideal, la cual debe eliminar el plasma seminal. Según Yamamoto *et al.* (1997). Estos medios de preparación de muestra seminal deben cumplir además otras características como, permitir procesar diferentes volúmenes de eyaculado, para que así se maximice el número de espermatozoides recuperados y minimizar el riesgo de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que puede afectar de forma negativa la integridad del ADN y, por tanto, la función espermática *in vitro*.

Las técnicas más comunes de preparación de muestra seminal son: Gradiente de densidades y swim-up. Sin embargo, Shyam *et al.* (2005) demostraron que existe una mayor recuperación de espermatozoides móviles utilizando el método de gradiente de densidades en comparación con la técnica swim-up en muestras de semen fresco y criopreservadas, en pacientes: astenozoospermicos y hombres de mala calidad seminal. Por otra parte, Chan *et al.* (2004) informaron una mayor tasa de recuperación después de la descongelación y motilidad con el método swim-up en comparación con gradiente de densidades, lo que puede deberse a las diferentes gradientes utilizadas (45 - 90 y 40 - 80 por ciento, respectivamente). Por esta razón en el presente estudio se optó por preparar las muestras seminales frescas y/o congeladas con gradiente de densidades utilizando dos medios de cultivo de marcas comerciales Irvine Scientific® y LifeGlobal GROUP®, con gradientes 45 y 95 por ciento.

En el caso de Irvine Scientific®, se trata de una suspensión coloidal de partículas de sílice estabilizada con silano hidrofílico unido covalentemente en HTF tamponado con HEPES, que ha sido filtrada a través de membrana y procesada en condiciones asépticas (IrvineScientific 2017). Por otro lado, el medio de cultivo de LifeGlobal GROUP®, es un medio con partículas de sílice recubiertas de silano en una solución acuosa que contiene: Cloruro de sodio, Cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, fosfato de potasio, bicarbonato de sodio, HEPES, glucosa, piruvato de sodio, lactato de sodio,

EDTA (LifeGlobal GROUP 2017). Según los resultados obtenidos, hay diferencia significativa entre el medio de cultivo Irvine Scientific® y LifeGlobal GROUP®, obteniéndose una mayor recuperación de espermatozoides móviles progresivos (34.79 ± 16.40 millones/mL) con Irvine Scientific®, y LifeGlobal GROUP®, de 31.75 ± 13.35 millones/mL.

Bird *et al.* (1991) comparó las tasas de embarazo en muestras congeladas de donantes para ser utilizadas en IUI, las que fueron preparadas con el medio Irvine Scientific®, demostrando que el mantener a temperatura ambiente la muestra seminal preparada con Irvine Scientific, produce una alcalinización del medio originando una influencia duradera en la fertilidad de los espermatozoides gracias a su composición.

No hay suficientes estudios que comparen medios de cultivo para la capacitación espermática. Sin embargo, los resultados de este estudio muestran que la realización de gradiente de densidades con el medio de cultivo Irvine Scientific®, es más eficiente que LifeGlobal GROUP®.

- CRIOPROTECTOR

En los crioprotectores con los que se realiza la congelación espermática, existen diversas sustancias que son capaces de cambiar la composición lipídica de la membrana celular mejorando su fluidez (Fernandez *et al.* 2009). Una de estas sustancias es la lecitina (origen de aceite de soja) o yema de huevo (contiene lecitina y fosfolípidos), brindan protección ante el shock por frío a la membrana plasmática. En la actualidad, se desconoce el mecanismo por el que estas sustancias protegen a las células del shock por frío, sin embargo, se asocia esta protección al efecto de la yema de huevo, que contiene una lipoproteína de baja densidad (LDL), que es posible que se una a la membrana de forma directa y así modifica su permeabilidad o activando enzimas de la membrana, tales como adenilato ciclasa, bombas iónicas, etc, estas enzimas posiblemente ayuden a mejorar el comportamiento osmótico.

El medio crioprotector Irvine scientific® contiene 20 por ciento yema de huevo, 12 por ciento de glicerol y $10 \mu\text{g/mL}$ de sulfato de gentamicina (IrvineScientific 2017). Esta formulación que no contiene azúcares tiene un buffer, ya que componentes como la yema de huevo puede afectar el pH total de la solución. Además, contiene TES (N-trisfosfato-hidroxi-metil-metil-2-aminoetanosulfónico ácido). Por otro lado, el medio crioprotector

LifeGlobal GROUP® contiene HEPES tamponado listo para usar que también contiene sales fisiológicas, glicina, dextrosa monohidratada, lactato, glicerol, sacarosa y albúmina sérica humana (3.95 mg/mL) (LifeGlobal GROUP 2017), éste último es uno de los componentes más importantes, puesto que se ha proporcionado evidencia de que la albúmina se adhiere directamente a la membrana plasmática del espermatozoide en el momento de diluir el semen con el medio crioprotector, su modo de acción es el siguiente, modifica la composición lipídica del espermatozoide por medio de hidrólisis o intercambio lipídico, promueve la hidrólisis de las proteínas de la membrana plasmática, genera la entrada de iones de calcio al citoplasma, reduce el colesterol, por tanto produce una fluidez de membrana mayor, en consecuencia, resistencia a la congelación (Fernandez *et al.* 2009), además reduce la cantidad de fosfolípidos presentes en la membrana plasmática del espermatozoide.

Se obtiene una mayor recuperación de espermatozoides móviles progresivos utilizando el tratamiento I, en el que se utiliza el crioprotector Irvine scientific® con una recuperación espermática de 12.32 ± 6.21 millones/mL, con una variación entre la muestra inicial y final de 48.24 por ciento, por tanto, una eficiencia de 51.76 por ciento. Por el contrario, se obtiene una baja recuperación espermática con el medio crioprotector LifeGlobal GROUP®, de 1.66 ± 1.01 millones/mL, con una variación entre la muestra inicial y final de 93.03 por ciento, por tanto, una eficiencia de 6.97 por ciento. Se han asociado estos resultados con la función defectuosa de los espermatozoides después de la congelación, a la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática, por lo que se recomienda que el medio crioprotector contenga sustancias que evitan la peroxidación de lípidos durante la congelación, estos son: Ditiotreitól, glutatión y butirato hidroxitolueno, los cuales han presentado mejoras en la motilidad e integridad acrosomal después de la descongelación. Además de quelantes como ácido etilendiaminotetra acético (EDTA) y citrato, puesto que durante un proceso de congelación se genera un descontrol de la concentración de calcio intracelular, estos componentes se encargarían de atrapar el calcio, en el caso de EDTA atrapa también otros iones metálicos y es posible que inhiba la peroxidación de lípidos, de esta manera EDTA y citrato disminuirían la gradiente de concentración en toda la membrana plasmática del espermatozoide. En el medio extracelular la concentración de calcio es cuatro veces mayor que en el interior de la célula (0.1 mM). La diferencia principal entre el medio crioprotector Irvine scientific® y LifeGlobal GROUP®, es la presencia de yema de huevo del primero, lo que ayuda a que se una a la membrana de

forma directa y así modifica su permeabilidad o activando enzimas de la membrana, tales como adenilato ciclasa, bombas iónicas, etc, estas enzimas posiblemente ayuden a mejorar el comportamiento osmótico, por tanto, generan una mayor recuperación espermática.

- METODOLOGÍA

El semen está constituido por una gran cantidad de diversos antioxidantes, que permiten a los espermatozoides resistir lesiones oxidativas. Dicho daño oxidativo se da principalmente por especies reactivas de oxígeno, como el radical hidroxilo, ión superóxido y peróxido de hidrógeno (Aitken *et al.* 1989), que son producidas durante la congelación espermática, estas consecuencias han sido reportadas y publicadas en una serie de estudios. Uno de ellos concluye que, la congelación de semen humano reduce la actividad antioxidante de L- carnitina (Grizard *et al.* 1992). Gadea *et al.* (2011) demostraron que el contenido de glutatión se reduce significativamente después de congelar el semen humano. A su vez, se observó una reducción significativa de la enzima superóxido dismutasa después de congelar (Lasso *et al.* 1994).

El mecanismo antioxidante que rodea a los espermatozoides involucra antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Smith *et al.* 1996). Las enzimas antioxidantes son: catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Pahune *et al.* 2013). Por otra parte, el mecanismo no enzimático en su mayoría incluye moléculas antioxidantes como: ácido ascórbico, glutatión, carotinas, taurina, piruvato, ubiquinol, L-carnitina, urato y α -tocoferol (Zini *et al.* 2011).

Se debe tener en cuenta que, la membrana plasmática de los espermatozoides posee grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados que pueden ser fácilmente oxidados por las especies reactivas de oxígeno (Tatone *et al.* 2010). Considerando lo anterior, los medios crioprotectores fabricados son complementados con antioxidantes. Los resultados obtenidos concuerdan con lo mencionado anteriormente, ya que la concentración de espermatozoides móviles progresivos mostró ser mayor utilizando el tratamiento I, en el que se mantuvo el plasma seminal durante la congelación, y se obtuvo 12.32 ± 6.21 millones/mL presentando una variación entre la muestra inicial y final de 48.24 por ciento. Sin embargo, en los demás tratamientos II, III, IV, V y VI presentaron menor recuperación de espermatozoides móviles progresivos (5.92 ± 2.84 , 9.64 ± 5.31 , 7.0 ± 4.09 , 5.22 ± 3.52 y 1.66 ± 1.01 millones/mL). El tratamiento que presentó una menor

recuperación espermática, mayor variación (93.03 por ciento) y, por tanto, menor eficiencia (6.97 por ciento) fue el tratamiento VI, en el que se retiró el plasma seminal antes de la congelación. Finalmente se corroboró la eficiencia del tratamiento I (51.76 por ciento).

De la misma manera, Donnelly *et al.* (2011), obtuvieron una mayor concentración de espermatozoides mótils progresivos cuando se ha capacitado la muestra seminal a diferencia de la muestra original en fresco, no obstante, al congelar en ambos casos, hay una mayor recuperación de espermatozoides mótils cuando se ha congelado la muestra original en fresco, es decir con plasma seminal, lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio. Esta mayor recuperación del tratamiento I, la explican Aitken *et al.* (1987), donde menciona que es debido principalmente a la presencia del plasma seminal, el cual contiene antioxidantes que evitan el daño por ataque de radicales libres, los que lesionan a los espermatozoides, los que carecen de mecanismos de reparación. Aitken *et al.* (1989) indican que la alta producción de especies reactivas de oxígeno, que se generan al someter células a un shock térmico, está muy asociada con la pérdida de motilidad espermática, además aseguran que existe una correlación inversa entre la cantidad de especies reactivas de oxígeno en el semen y porcentaje de espermatozoides mótils recuperados. Por lo tanto, la congelación de muestra seminal es conveniente realizarlo con el plasma seminal dado que, se obtiene una mayor recuperación de espermatozoides mótils progresivos. Por lo tanto, la mejor metodología para realizar la congelación espermática es manteniendo el plasma seminal, dado el importante papel protector en los espermatozoides.

V. CONCLUSIONES

- Se obtuvo una mayor eficiencia en la recuperación de espermatozoides móviles progresivos con:

El tratamiento de congelación espermática I (-80°C por 24h, y luego -196°C).

El tratamiento de descongelación espermática I (21°C por 10 minutos, y luego 35°C por 20 minutos,).

El tratamiento post descongelación espermática II y III (Realizando gradiente de densidades y lavado).

El medio de cultivo y crioprotector (Irvine Scientific®), además de congelar en presencia del plasma seminal (metodología).

VI. RECOMENDACIONES

- Se sugiere dejar la gradiente de densidades de los medios de cultivo a temperatura ambiente por un tiempo no menor a una hora, para que de esta manera no afecte la motilidad progresiva de los espermatozoides.
- Se sugiere comparar otras marcas comerciales de medios de cultivo y crioprotector, utilizando la marca comercial Irvine Scientific® como control.
- Se sugiere comparar la efectividad del tratamiento o marca comercial en base a la variación de los E.M.P después de la descongelación del criovial.
- Se sugiere realizar gradiente de densidades después de descongelar los crioviales para eliminar el exceso de espermatozoides inmóviles o muertos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aitken, RJ; Clarkdon, JS; Fishel, S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction* 41(1): 183-197.
2. Aitken, RJ; Clarkson, JS. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 81(2):459-469.
3. Aitken, RJ; Clarkson, JS; Hargreave, TB; Irvine, DS; Wu, FC. 1989. Analysis of the relationship between defect sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *Journal of Andrology* 10(3):214-220.
4. Aitken, RJ; Fisher, H. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays* 16(3):259-267. Cita: (Aitken *et al.* 1994)
5. Allamaneni, SS; Agarwal, A; Rama, S; Ranganathan, P; Sharma, RK. 2005. Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatazoa. *Asian Journal of Andrology* 7(1):86-92.
6. Bailey, JL; Robertson, L; Buhr MM. 1994. 1994. Relationships among *in vivo* fertility, computer-analysed motility and *in vitro* Ca²⁺ flux in bovine spermatozoa. *Canadian Journal Animal Science* 74(1): 53-58.
7. Banihani, S; Agarwal, A; Sharma, R; Bayachou, M. 2014. Cryoprotective effect of l-carnitine on motility, vitality and DNA oxidation of human spermatozoa. *Andrologia* 46(6): 637-641.
8. Banihani, S; Sharma, R; Bayachou, M; Sabanegh, E; Agarwal, A. 2012. Human sperm DNA oxidation, motility and viability in the presence of L-carnitine during *in vitro* incubation and centrifugation. *Andrologia* 44(1): 505-512.
9. Banihani, S; Sharma, R; Bayachou, M; Sabanegh, E; Agarwal, A. 2012. Human sperm DNA oxidation, motility and viability in the presence of L-carnitine during *in vitro* incubation and centrifugation. *Andrologia* 44(1): 505-512.

10. Banihani, SA; Alawneh, RF; Awad, AA. 2016. Human semen cryopreservation reduces the seminal antioxidant reservoir. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science* 70:3-6.
11. Barros, C; Franklin, B. 1968. Behaviour of the gamete membranes during sperm entry into the mammalian egg. *Journal of Cell Biology* 37(3):13-18.
12. Barthelemy, C; Royere, D; Hammahah, S; Lebos, C; Tharanne, MJ; Lansac, J. 1990. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Iranian Journal of reproductive medicine* 8(3):119-124.
13. Bedford, JM. 1967. Effect of duct ligation on the fertilizing capacity of spermatozoa in the epididymis. *Journal of Experimental Zoology* 166(2):271–281.
14. Benoff, S; Cooper, GW; Hurley, I; Mandel, FS; Rosenfeld, DL. 1993. Antisperm antibody binding to human sperm inhibits capacitation induced changes in the level of plasma membrane sterols. *American Journal of Reproductive Immunology* 30:113–130.
15. Benoff, S; Hurley, I; Cooper, GW; Mandel, FS; Hershlag, A; Scholl, GM; Rosenfeld, DL. 1993. Fertilization potential *in vitro* is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Human Reproduction* 8(12):2155–2166.
16. Beydola, T; Sharma, RK; Lee, W; Agarwal, A. 2013. Sperm preparation and selection techniques. In *Male Infertility Practice*. Edited by Rizk, B; Aziz, N; Agarwal, A. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers 29:244–251.
17. Brugh, VM; Matschke, HM; Lipshultz, LI. 2003. Male factor infertility. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America* 32(3):698-707.
18. Byrd, W; Ackerman, GE; Bradshaw, KD; Maddox, MA; Svendsen, BA; Carr, BR. 1991. Comparison of bicarbonate and HEPES-buffered media on pregnancy rates after intrauterine insemination with cryopreserved donor sperm. *Fertility and sterility* 56(3):540-546.
19. Caballero, P; Núñez, R; Vázquez, I. Técnicas de congelación y descongelación del semen. 1995. En: Pellicer, A; Bonilla-Musoles, F; Cano, A; Crespo, J; De los Santos, MJ; Gil-Salom, M. Instituto Valenciano de Infertilidad y Facultad de Medicina, Universidad de Valencia. *Cuadernos de Medicina Reproductiva*. 1:87-106.
20. Calamera, JC; Buffone, MG; Doncel, GF; Brugo-Olmedo, S; Vincentiis, S; Calamera, MM; Storey, BT; Alvarez, JG. 2010. Effect of thawing temperature on

- the motility recovery of cryopreserved human spermatozoa. *Fertil Steril* 93:789–974.
21. Carlsen, E; Giwercman, A; Keiding, N; Skakkebaek, NE. 1992. Evidencia de disminución de la calidad del semen durante los últimos 50 años. *BMJ* 305: 609-613.
 22. Cathcart, R; Schwiers, E; Saul, RL; Ames, BN. 1984. Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: A possible assay for oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 81(1):5633–5637.
 23. Chan, CC; Chen, IC; Liu, JY; Huang, YC; Wu, GJ. 2004. Comparison of nitric oxide production motion characteristics of sperm after cryopreserved in three different preparations. *Archives of Andrology* 50: 1–3.
 24. Clermont Y. 1969. Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*). *American Journal of Anatomy* 126(1):57–71.
 25. Clermont, Y. 1963. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy* 112:35–51.
 26. CO G. 2009. Fisiología de la reproducción humana. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción* 1(4):115-130.
 27. Donnelly, ET; McClure, N; Lewis, SE. 1999. Antioxidant supplementation *in vitro* does not improve human sperm motility. *Fertility and Sterility* 72:484-495.
 28. Donnelly, ET; McClure, N; Lewis, SEM. 2000. Glutathione and hypotaurine *in vitro*: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis* 15(1):61–68.
 29. Donnelly, ET; McClure, N; Lewis, SEM. 2011. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertility and Sterility* 76(5):892-900.
 30. Drobnis, EZ; Crowe, LM; Berger, T; Anchoroguy, TJ; Overstreet, JW; Crowe, JH 1993. Cold shock damage is due to lipid phasetransitions in cell-membranes — a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology* 265(4): 432–437.
 31. Du Plessis, SS; McAllister, DA; Luu, A; Savia, J; Agarwal, A; Lampiao, F. 2010. Effects of H₂O₂ exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels. *Andrologia* 42(3): 206-210.

32. Enciso, M; Iglesias, M; Galán, I; Sarasa, J; Gosálvez, A; Gosálvez, J. 2011. The ability of sperm selection techniques to remove single- or double-strand DNA damage. *Asian Journal of Andrology* 13(5):764–768.
33. Falcone, T; Hurd, WW; 2007. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: Physiology of Male Gametogenesis*. Rakesh, KS. Ed. rev. Philadelphia. Elsevier. p. 73-83.
34. Fernandez, M; Gonzalvo, M; Clavero, A; Ruiz de Assín, R; Zamora, S; Roldán, M; Rabelo, B; Ramirez, JP; Yoldi, A; Castilla, JA. 2009. Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *Asebir* 14(1):17-25.
35. Fuller, B; Paynter, S. 2004. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive Biomedicine Online* 9(6): 680-691.
36. Gadea, J; Molla, M; Selles, E; Marco, MA; Garcia-Vasquez, FA; Gardon, JC. 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Criobiology* 62(1):40-46.
37. Gao, DY; Liu, J; Liu, C; McGann, LE; Watson, PF; Kleinhans, FW; Mazur, P; Critser, ES; Critser, JK. 1995. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction* 10(5):1109-1122.
38. Gilmore, JA; Liu, J; Gao, DY; Critser, JK. 1997. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Human Reproduction* 12(1): 112–118.
39. Gilmore, JA; Liu, L; Gao, DY. 1997. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Human Reproduction* 12(1):112–118.
40. Gilmore, JA; McGann, LE; Liu, J; Gao, DY; Peter, AT; Kleinhans, FW; Critser, JK. 1995. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* 53(5): 985–995.
41. Grizard, G; Lombard-Vignon, N; Boucher, D. 1992. Changes in carnitine and acetylcarnitine in human semen during cryopreservation. *Human Reproduction* 7(9): 1245-1248.
42. Halliwell, B; Gutteridge, JMC. 1986. Oxygen-free radicals and iron in relation to biology and medicine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 246(2):501-514.
43. Halliwell, B; Gutteridge, JMC. 1989. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford, United Kingdom: Clarendon Press.

44. Hammadeh, ME; Greiner, S; Rosenbaum, P; Schmidt, W. 2001. Comparison between human sperm preservation medium and TEST-Yolk Buffer on Protecting Chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure. *Journal of Andrology* 22:1012-1008.
45. Hammerstedt, RH; Graham, JK; Nolan, JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology* 11(1): 73–88.
46. Henry, MA; Noiles, EE; Gao, D. 1993. Cryopreservation of human spermatozoa. IV The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity and mitochondrial function. *Fertility and Sterility* 60(5):911–918.
47. Henry, MA; Noiles, EE; Gao, D; Mazur, P; Critser, JK. 1993. Cryopreservation of human spermatozoa. The effect of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertility and Sterility* 60:911-918.
48. Holt, WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 62(1-3): 3-22.
49. Huckins C. 1971. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *The Anatomical Record* 169(3):533–557.
50. Jayaraman, V; Upadhyay, D; Narayan, PK; Adiga, SK. 2012. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 29(6):557–563.
51. Jegou, B. 1992. The Sertoli cell. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 6(2):273–311.
52. Karow, AM; Webb, WR. 1965. Tissue freezing. A theory for injury and survival. *Cryobiology* 2(3): 99-108.
53. Keel, BA; Webster, BW; Robert, DK. 1987. Effects of cryopreservation on the motility characteristics of human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 81:213-220.
54. Kovalski, NN; de Lamirande, E; Gag-non, C. 1992. Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertility and Sterility* 58(4):809-816.

55. Kruger, TF; Menkveld, R; Stander, FS; Lombard, CJ; Van Zyl, JA; Smith, K. 1986. Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility* 46(6):1118–1123.
56. Langlais, J; Zollinger, M; Plante, L; Chapdelaine, A; Bleau, G; Roberts, KD. 1981. Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:7266-70.
57. Lasso, JL; Noiles, EE; Alvarez, JG; Storey, BT. 1994. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *Journal of Andrology* 15(3): 255-265.
58. Leibo, SP; Farrant, J; Mazur, P; Hanna, MG; Smith, LH. 1970. Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol. *Cryobiology* 6(4): 315–332.
59. Lewis, SEM; Sterling, ESL; Young, IS; Thompson, W. 1997. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility* 67(1):142–147.
60. Lovelock, JE; Polge, C. 1954. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochemical Journal* 58(4): 618–622.
61. Mahanes, MS; Ochs, DL; Eng LA. 1986. Cell calcium of ejaculated rabbit spermatozoa before and following *in vitro* capacitation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 134(2):664–670.
62. Malvezzi, H; Sharma, R; Agarwal, A; Abuzenadah, AM; Abu-Elmagd, M. 2014. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12(1):121.
63. Mazur, P. 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *The Journal of General Physiology* 47:347-369.
64. Mazur, P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14(3): 251-272.
65. Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology* 247(3):125–142.

66. Mazur, P; Leibo, SP; Farrant, J. 1970. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In: Wolstenholme, G.E.W., O'Connor, M. Eds., *The Frozen Cell*, London: Churchill 69–88.
67. Menkveld, R; Stander, FS; Kotze, TJ; Kruger, TF; Van Zyl, JA. 1990. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction* 5(5):586–592.
68. Morris, GJ; Acton, E; Avery, S. 1999. A novel approach to sperm cryopreservation. *Human Reproduction* 14(4):1013-1021.
69. Mortimer, D. 2000. Sperm preparation methods. *Journal of Andrology* 21: 357–66.
70. Mossad, H; Morshedi, M; Toner, JP; Oehninger, S. 1994. Impact of cryopreservation on spermatozoa from infertile men: implications for artificial insemination. *Archives of Andrology* 33:51–57.
71. Nada, EA; El Taieb, MA; Ibrahim, HM; Al Saied, AE. 2015. Efficacy of tamoxifen and l-carnitine on sperm ultrastructure and seminal oxidative stress in patients with idiopathic oligoasthenozoospermia. *Andrologia* 47(7):801-810.
72. Naina, K and Amit, KS. 2015. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences* 8(4): 191–196.
73. Nei, T. 1978. Structure and function of frozen cells: freezing patterns and post-thaw survival. *Journal of Microscopy* 112(2): 197-204.
74. Nijs, M; Ombelet, W. 2001. Cryopreservation of human sperm. *Human Fertility* 4(3): 158-163.
75. Olivera M; Ruiz T; Tarazona A; Giraldo C. 2006. El espermatozoide desde el eyaculado, hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencia Pecuarias*. 19(4):426-434.
76. Pahune, PP; Choudhari, AR; Muley, PA. 2013. The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 7(6): 991-995.
77. Payne, AH; Downing, JR; Wong K-L. 1980. Lutenizing hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of Leydig cells. *Endocrinology* 106(5):1424–1429.

78. Ragni, G; Caccamo, AM; Della Serra, A. and Guercilena, S. 1990. Computerized slow-staged freezing of semen from men with testicular tumors or Hodgkins disease preserves sperm better than standard vapour freezing. *Fertility and Sterility* 53(6):1072–1075.
79. Rall, W; Reid, D; Farrant, J. 1980. Innocuous biological freezing during warming. *Nature (London)* 286: 511-514.
80. Ravnik, SE; Zarutskie, PW; Muller, CH. 1992. Purification and characterization of a human follicular fluid lipid transfer protein that stimulates human sperm capacitation. *Biology of Reproduction* 47(6):1126–1133.
81. Rogers, BJ; Perreault, SD; Bentwood, BJ; McCarville, C; Hale, RW; Soderdahl, DW. 1983. Variability in the human-hamster *in vitro* assay for fertility evaluation. *Fertil Steril* 39: 204–211.
82. Royere, D; Barthelemy, C; Hamamah, S; Lansac, J. 1996. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Human Reproduction. Update* 2(6):553–559.
83. Saleh, R; Agarwal, A. 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology* 23: 737–52.
84. Schulze C. 1974. Morphological characteristics of the spermatogonial stem cells in man. *Cell and Tissue Research* 198(2):191–199.
85. Serafini, P. and Marrs, RP. 1986. Computerized staged freezing technique improves sperm survival and preserves penetration of zona-free hamster ova. *Fertility and Sterility*. 45(6):854 –858.
86. Shyam, SR; Agarwal, AA; Rama, S; Ranganathan, P; Sharma, RK. 2005. Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa. *Asian Journal of Andrology* 7 (1): 86–92.
87. Smith, R; Vantman, D; Ponce, J; Escobar, J; Lissi, E. 1996. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Human Reproduction* 11(8): 1655-1660.
88. Swan, SH; Elkin, EP; Fenster, L. 2000. La cuestión de la disminución de la densidad del esperma revisada: un análisis de 101 estudios publicados de 1934-1996. *Perspectiva de salud ambiental* 108: 961–966.
89. Thiele, JJ; Freisleben, HJ; Fuchs, J; Oschendorf, FR. 1995. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Human Reproduction* 10(1):110-115.

90. Thomas, P; Meizel, S. 1989. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca^{2+} influx. *Biochemica Journal* 264(2):539–546.
91. Toro A. 2009. Espermograma. *Medicina & Laboratorio*. 15 (3-4):145-169.
92. Twigg, JP; Irvine, DS; Aitken, RJ. 1998. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 13(7):1864–1871.
93. Van Alphen, MM; Van de Kant, HJ; de Rooij, DG. 1988. Depletion of the spermatogonia from the seminiferous epithelium of the rhesus monkey after X irradiation. *Radiation Research* 113(3):473–486.
94. Verheyen, G; Vernaev, V; Van Landuyt, L; Tournaye, H; Devroey, P; Van Steirteghem, A. 2004. Should diagnostic testicular sperm retrieval followed by cryopreservation for later ICSI be the procedure of choice for all patients with non-obstructive azoospermia?. *Human Reproduction* 19(12):2822-2830.
95. Wooley, DM; Richardson, DW. 1978. Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *Journal Reproduction of Fertility* 53:389-394.
96. Yamamoto, Y; Maenosono, S; Okada, H; Miyagawa, I; Sofikitis, N. 1997. Comparisons of sperm quality, morphometry and function among human sperm populations recovered via SpermPrep II filtration, swim-up and Percoll density gradient methods. *Andrologia* 29: 303–310.
97. Zakova, J; Lousová, E; Ventruba, P; Crha, I; Pochopová, H; Vinklarkova, J; Tesarová, E. 2014. Sperm cryopreservation before testicular cancer treatment and its subsequent utilization for the treatment of infertility. *The Scientific World Journal* 2014:1-5.
98. Zegers-Hochschild, F; Adamson, GD; de Mouzon, J; Ishihara, O; Mansour, R; Nygren, K. 2009. El Comité Internacional para el Monitoreo de la Tecnología Reproductiva Asistida (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) revisaron el glosario de terminología de ART. *Fertil Steril* 92: 1520–1524.
99. Zhu, WJ; Liu, XG. 2000. Cryodamage to plasma membrane integrity in head and tail regions of human sperm. *Asian Journal of Andrology* 2:135-138.
100. Zini, A; Al-Hathal, N. 2011. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? *Asian Journal of Andrology* 13(3): 374-381.

101. Zini, A; de Lamirande, E; Gagnon, C. 1993. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 16(3):183-188.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: MATERIALES

8.1 BIOLÓGICOS

- Muestra seminal

8.2 QUÍMICOS

- Medio de cultivo Isolate (Irvine Scientific)
- Medio de cultivo AllGrad (LifeGlobal Group)
- Medio de lavado Sperm washing (Irvine Scientific)
- Medio de lavado AllWash (LifeGlobal Group)
- Crioprotector Freezing medium TYB (Irvine Scientific)
- Crioprotector Sperm Freezing (LifeGlobal Group)
- Nitrógeno líquido
- Alcohol de 96°

8.3 OPERATIVOS Y FÍSICOS

- Frascos estériles
- Agua destilada
- Viales (1, 2mL)
- Pipetas cónicas
- Cámara Makler
- Tubos Falcon 10 mL
- Pipetas de vidrio 10 mL
- Pipetas de plástico 1, 5, 10 mL
- Bombilla
- Marcadores indelebles
- Papel toalla
- Microscopio

- Cámara Makler
- Cámara de flujo
- Estufa de incubación de 35 °C.
- Centrífuga
- Pipeteador automático
- Tanques de nitrógeno líquido

8.4 DE PROTECCIÓN

- Guantes quirúrgicos
- Mascarillas
- Gorro
- Bata de Laboratorio.

Anexo 2: ÁREA DE TOMA DE MUESTRA



Figura 5: Área de Toma de Muestra. Zona de Lavado e indicaciones para el paciente en español e inglés.

Anexo 3: INDICACIONES EN EL ÁREA DE TOMA DE MUESTRA

- La obtención de la muestra seminal es en frasco estéril únicamente por masturbación.
- Lavarse las manos con agua y jabón.
- Realizar una higiene prolija de los genitales.
- Lavarse nuevamente las manos con agua y jabón, luego secarse.
- Proceder a masturbarse y depositar la muestra en el frasco estéril que se le ha entregado. Si parte de la muestra cae fuera del frasco, no tratar de recogerla e informar lo sucedido al momento de entregar dicho frasco.
- No se recibirán las muestras con signos visibles de haber sido contaminadas externamente o con el frasco que evidencie derrame del contenido.
- Al terminar el procedimiento tocar el timbre que se encuentra a la izquierda del interruptor de luz.
- Abra la puerta y espere a ser atendido por el personal del laboratorio.

Anexo 4: LABORATORIO DE ANDROLOGÍA



Figura 6: Laboratorio de Andrología

Anexo 5: EQUIPOS DEL LABORATORIO DE ANDROLOGÍA



Figura 7: Equipos. Microscopios, pipeteador, centrífuga, contómetro, estufa y cámara de flujo laminar.

Anexo 6: REALIZACIÓN DE ESPERMATOGRAMA



Figura 8: Espermatoograma. Material necesario para realizar un espermatoograma. Medición del volumen de la muestra seminal con una pipeta volumétrica de plástico. Medición del ph de la muestra seminal.

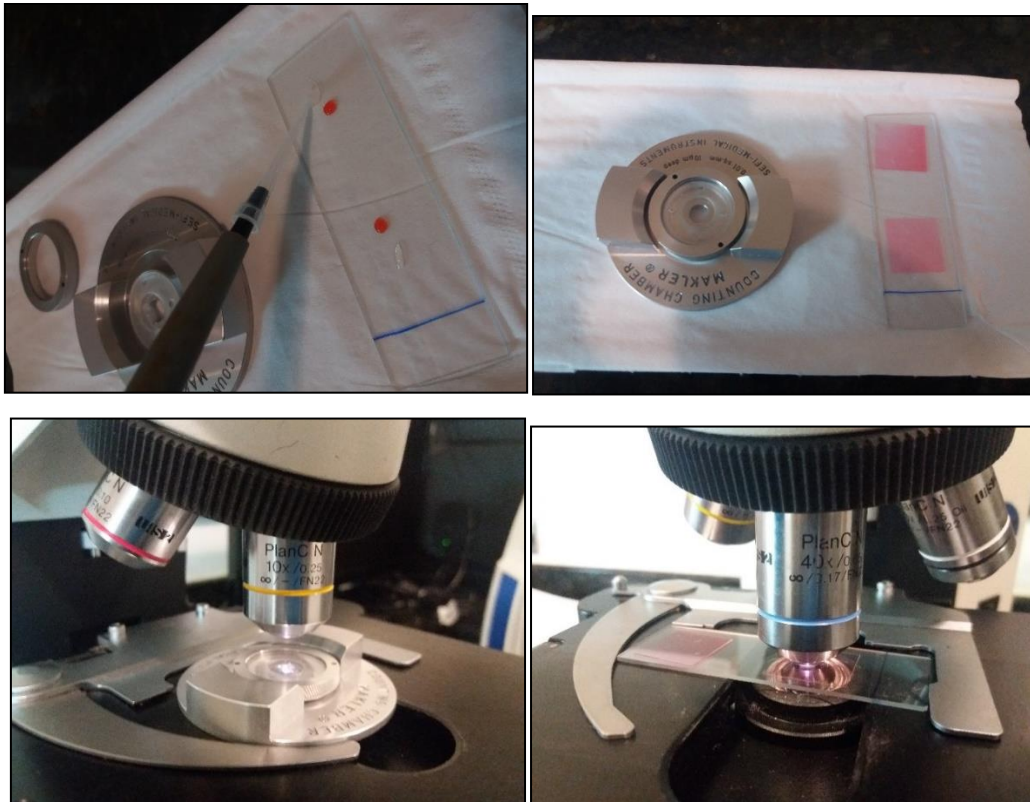


Figura 9: Viabilidad espermática. Preparación de la muestra con eosina para la observación de la viabilidad y morfología espermática. En la cámara Makler para observar todos los parámetros microscópicos.

Anexo 7: PROCEDIMIENTO DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA POR GRADIENTES DE DENSIDAD

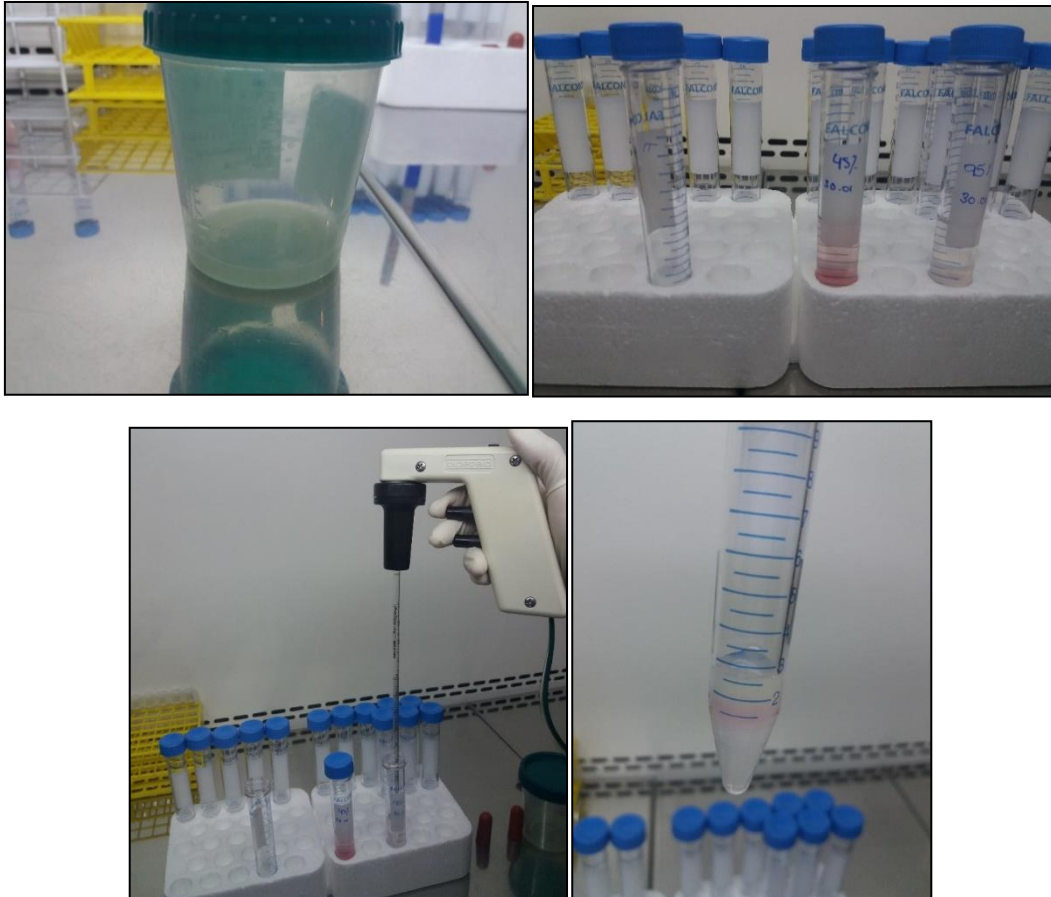


Figura 10: Capacitación espermática. Gradientes de densidad de 45 y 95 por ciento. Extraer la gradiente de 45 por ciento y agregarlo lentamente sobre la capa de 95 por ciento. Llevar la gradiente a la centrífuga por 10 minutos a 1000rpm.

Anexo 8: PROCEDIMIENTO DE CONGELACIÓN

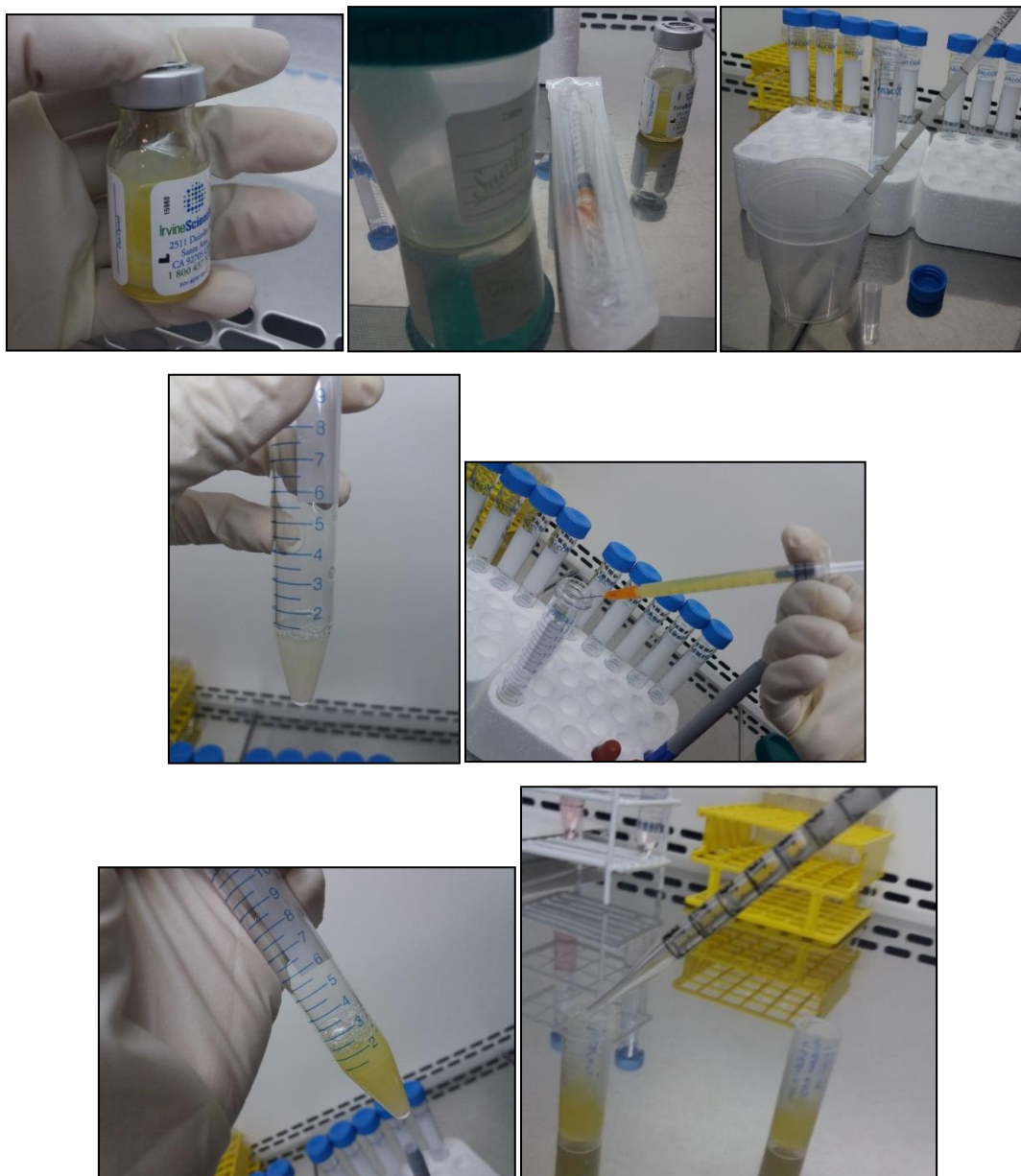


Figura 11: Congelación espermática.

Anexo 9: ESPERMATOGRAMA DE PACIENTES SELECCIONADOS

Tabla 5: Resultado de los espermogramas realizado a todos los pacientes normozoospermicos seleccionados.

N°	ESPERMATOGRAMA							
	VOLU MEN (mL)	pH	VISCO SIDAD	DEBRIS	AG L.	C.R (millones/ mL)	VIABILIDAD (%)	MORFO LOGÍA NORMA L ()
1	2.3	8.1	Normal	++	+	0.9	85	4
2	2	7.9	Normal	+	+	0.5	88	6
3	2.5	7.9	Normal	+	+	0.5	88	5
4	2.5	7.9	Normal	+	+	0.5	88	7
5	2.8	8.3	Normal	+	-	0.4	88	4
6	2.9	8.3	Normal	+	-	0.4	88	4
7	3	7.9	Normal	++	+	2	90	4
8	2	7.9	Normal	++	+	2	90	5
9	2.1	8.1	Normal	++	+	0.1	89	4
10	2	7.9	Normal	+	+	0.8	90	6
11	2	7.9	Normal	+	+	0.9	90	4
12	3	8.1	Normal	+	+	1	90	4
13	2	7.9	Normal	+	+	0.5	88	4
14	2.9	8.1	Normal	++	-	0.5	85	4
15	3	7.9	Normal	+++	-	0.5	90	4
16	2.1	7.9	Normal	++	+	1	90	4
17	2.1	8.3	Normal	+	+	0.5	86	4
18	3.3	8.1	Normal	+	+	0.9	88	4
19	2.2	7.9	Normal	+	+	0.6	90	4
20	2.5	8.3	Normal	+	+	0.5	85	6
21	2.3	7.9	Normal	++	+	0.5	88	5
22	2.4	8.3	Normal	+	+	0.5	90	5
23	2.5	7.9	Normal	++	-	1	88	5
24	2.6	8.1	Normal	++	-	0.8	90	4
25	1.5	8.1	Normal	+	+	0.8	87	6
26	1.5	7.9	Normal	++	+	1	90	4
27	2.6	8.1	Normal	+	+	0.7	90	4
28	2.7	7.9	Normal	+	+	0.5	88	4
29	1.7	7.9	Normal	++	+	0.5	85	4
30	2.8	7.9	Normal	+	+	0.7	85	4
31	2.8	8.3	Normal	+	+	0.7	85	4
32	1.9	8.3	Normal	++	-	0.5	85	6
33	1.9	7.9	Normal	+++	-	1	85	4
34	2.9	8.1	Normal	++	+	0.5	90	4

CONTINUACIÓN...

35	1.5	8.1	Normal	+	+	0.6	90	6
36	2.9	8.3	Normal	+	+	1	85	4
37	3	8.3	Normal	+	+	0.5	90	4
38	1.3	8.3	Normal	+	+	1	88	6
39	3	7.9	Normal	++	+	0.5	90	4
40	2.3	7.9	Normal	+	+	0.5	89	5
41	2	8.1	Normal	++	-	0.5	90	5
42	1.6	8.1	Normal	++	-	0.9	89	5
43	3	8.1	Normal	+++	+	0.5	88	4
44	2.5	7.9	Normal	++	+	0.9	90	5
45	2	7.9	Normal	++	+	0.5	88	6
46	3	7.9	Normal	++	+	1	89	5
47	2.2	7.9	Normal	++	+	1	92	5
48	3.1	8.3	Normal	+	+	1	89	4
49	2	8.3	Normal	+	+	1	85	5
50	1.5	7.9	Normal	++	-	0.5	92	4
51	2	8.3	Normal	+++	-	0.5	87	7
52	3	7.9	Normal	++	+	0.3	85	7
53	3.1	7.9	Normal	+	+	0.9	89	3
54	3.3	8.3	Normal	+	+	1	92	4
55	2.5	7.9	Normal	+	-	1	89	4
56	2.5	7.9	Normal	+	+	1	90	5
57	3.5	8.3	Normal	++	+	0.8	90	5
58	2.4	7.9	Normal	+	+	0.9	90	5
59	3.5	8.3	Normal	+	-	1	90	6
60	2.1	8.1	Normal	+	-	0.5	88	4
61	2.6	8.3	Normal	++	+	0.5	88	4
62	2	7.9	Normal	+	+	0.5	88	4
63	2.8	7.9	Normal	++	-	1	89	4
64	2.8	8.3	Normal	+	-	1	90	4
65	2.4	7.9	Normal	++	-	0.5	88	7
66	3.5	8.1	Normal	++	+	1	88	7
67	1.6	8.1	Normal	+	+	1	90	4
68	3.6	7.9	Normal	++	-	0.5	88	5
69	1.5	8.3	Normal	+	-	0.5	90	4
70	3.3	7.9	Normal	+	-	0.5	88	6
71	2	7.9	Normal	+	-	0.9	88	5
72	1.5	7.9	Normal	+	+	0.9	89	5
73	1.9	8.3	Normal	++	-	0.5	85	5
74	3.1	7.9	Normal	+	+	0.5	90	3
75	3	8.3	Normal	++	+	0.5	90	4
76	2.7	8.1	Normal	++	+	0.8	85	4
77	2.4	7.9	Normal	+	-	0.8	90	4
78	4	8.3	Normal	++	-	1	85	4
79	2.6	7.9	Normal	+++	-	0.5	90	6
80	2.4	8.1	Normal	+	-	1	85	6
81	2.1	7.9	Normal	+	-	0.8	86	4

CONTINUACIÓN...

82	3	7.9	Normal	+	-	1	87	4
83	3	7.9	Normal	+	-	0.5	87	4
84	3.2	8.1	Normal	+	-	0.5	90	5
85	3.2	8.1	Normal	++	-	0.4	88	4
86	3.2	8.3	Normal	++	-	0.5	89	4
87	2.4	8.3	Normal	++	-	1	87	4
88	2.4	7.9	Normal	+	-	1	88	5
89	2.3	7.9	Normal	+++	-	1	85	4
90	2.5	7.9	Normal	+	+	0.5	86	4
91	2.5	8.1	Normal	+	+	0.5	90	5
92	2.5	7.9	Normal	+	-	0.5	89	7
93	2.5	7.9	Normal	+++	+	0.5	89	8
94	2.9	7.9	Normal	+++	-	0.9	90	8
95	2.7	7.9	Normal	+	+	0.7	89	5
96	2.9	7.9	Normal	++	+	1	86	5
97	2.8	8.1	Normal	++	+	0.6	89	4
98	2.8	8.1	Normal	++	+	0.9	88	4
99	4	7.9	Normal	+	-	1	88	4
100	2.5	7.9	Normal	+	-	1	86	4