



Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



Artigo de revisão

O impacto da criopreservação na qualidade seminal[☆]

Vivian Taís Fernandes Cipriano^{a,*} e Gilberto da Costa Freitas^{b,c}

^a Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

^b Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^c Serviço de Reprodução Humana, Hospital Pérola Byington, São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 26 de setembro de 2013

Aceito em 25 de outubro de 2013

On-line em 3 de julho de 2014

Palavras-chave:

Técnicas reprodutivas

Fertilidade

Infertilidade masculina

Criopreservação

Análise de sêmen

R E S U M O

Introdução: as indicações iniciais para o uso da técnica de fertilização *in vitro* contemplavam boa parte dos diagnósticos de infertilidade feminina. Com o passar do tempo, tornou-se necessário o desenvolvimento de outras tecnologias que tratassem também os casos de infertilidade masculina. Dentre elas, destaca-se a criopreservação de gametas. Apesar das vantagens do uso da criopreservação, sabe-se que alguns processos de congelamento podem afetar o potencial de fertilidade em muitos aspectos.

Objetivo: por meio de uma revisão, verificar o impacto da criopreservação na qualidade do sêmen por meio da observação da taxa de gestação, taxa de aborto e das características seminais (morfologia, motilidade, concentração, fragmentação do DNA) no sêmen congelado e o no fresco, colhidos diretamente do epidídimo.

Método: foi feita uma estratégia de busca nas bases de dados Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) e Biblioteca Cochrane por meio das seguintes palavras-chaves: *sêmen*, *criopreservação*, *frozen sêmen*, *thawed sêmen* e *sêmen quality*. As pesquisas foram feitas tanto nos artigos e nas revisões disponíveis em *full text* como nos resumos.

Resultados: de maneira geral, o que se observou foi que em alguns casos a criopreservação pode prejudicar a morfologia seminal. Porém, a quantidade de nascimentos e de abortos não varia significativamente quando comparado sêmen fresco com congelado obtidos diretamente do epidídimo.

Conclusões: por prolongar a fertilidade de muitos pacientes e ajudá-los na realização do sonho da paternidade, na maioria dos casos, a criopreservação é uma boa técnica que deve ser usada quando necessário.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](#)

The impact of the cryopreservation on seminal quality

A B S T R A C T

Introduction: the initial indications to the use of *in vitro* fertilization technologie attended almost all the female infertility cases. Over the time, the development of others technologies

Keywords:

Reproductive techniques

[☆] Trabalho realizado no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: viviancipriano@usp.br (V.T.F. Cipriano).

Fertility
Male infertility
Cryopreservation
Sperm analysis

that could treat the male infertility cases too became necessary. Among the technologies, it can be standed out the gametes cryopreservation. Despite the cryopreservation advantages, it is known that some freezing processes can affect fertility potential in many ways.

Objective: verify the impact of cryopreservation on semen quality by observing the pregnancy rate, abortion rate and seminal characteristics (morphology, motility, concentration and DNA) fragmentation between frozen semen and fresh semen harvested directly from the epididymis, through a review.

Method: for this, it was done a research in the databases Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) and Cochrane using the following keywords semen cryopreservation, frozen semen, thawed semen and semen quality. The surveys were made both in articles and reviews available in full text as in the summaries.

Results: in general, the seminal cryopreservation may damage the morphology of semen. However, the number of births and abortions does not vary significantly when compared frozen semen with fresh semen obtained directly from the epididymis

Conclusions: thus, by extending the fertility of many patients, helping them in achieving the dream of paternity in most cases, cryopreservation is a good technique that can be used when necessary.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.
Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](#)

Introdução

O nascimento do primeiro bebê concebido por meio de técnicas de reprodução humana assistida (RHA) ocorreu em 1978.¹ Acontecimento de extrema importância para a medicina reprodutiva, que só foi reconhecido 30 anos depois por meio da premiação de Robert Edwards com o Nobel de Medicina e Fisiologia, em 2010.

A técnica de fertilização *in vitro* descrita inicialmente tem várias etapas: estimulação da ovulação, coleta dos oócitos e coleta de oócitos de suporte de fase lútea, seguidas pela fertilização *in vitro* e transferência dos embriões. As indicações iniciais dessa técnica contemplavam boa parte dos diagnósticos de infertilidade, principalmente para os casos de obstrução tubária. Entretanto, alguns diagnósticos, como o fator masculino grave, não eram solucionados por ela.²⁻⁴ Com isso, várias outras tecnologias foram desenvolvidas paralelamente, com o objetivo de potencializar os resultados da técnica inicial e favorecer casos de infertilidade masculina. Dentre elas, destaca-se a criopreservação de gametas.⁵⁻⁷ O interesse na criopreservação e no armazenamento de sêmen data de 1776, quando se observou que em temperaturas frias os espermatozoides humanos tornavam-se lentos e chegam ao estado de completa inativação. Esse quadro se revertia com o aumento da temperatura.^{8,9}

Em 1866, com o objetivo de preservar amostras de homens mortos em batalhas, pesquisadores sugeriram a possibilidade de um banco de sêmen humano. Em 1938, 70 anos depois, foi observada a sobrevivência de espermatozoides humanos por longos períodos quando resfriados em CO₂ sólido, sob temperatura de -79° C. A partir de então, concluiu-se que espermatozoides sobreviveriam em temperaturas abaixo de 160° C negativos.⁹

Em 1949, foi relatado o primeiro uso do glicerol como crioprotetor e iniciou-se um rápido desenvolvimento das técnicas de criopreservação e de soluções crioprotetoras.¹⁰ De 1962 a

1963, o vapor de nitrogênio líquido foi usado para criopreservar amostras de sêmen até que, em 1963, descobriu-se que o armazenamento do espermatozoide humano no nitrogênio líquido em temperatura de -196° C era mais eficiente do que sob -75° C.⁸

Para criopreservação, dois tipos de congelamento são usados: lento e rápido. O primeiro é um método no qual a amostra é gradualmente resfriada na fase de vapor por cerca de 40 minutos. Já no congelamento rápido, normalmente coloca-se o sêmen em suspensão em vapor de nitrogênio líquido para armazená-lo em temperatura de 196°C negativos.¹¹ As amostras podem ser descongeladas lentamente, sob temperatura ambiente por 30 a 60 minutos, ou rapidamente, sob 37° C por cinco a 10 minutos, antes de estarem prontas para remoção do crioprotetor.¹⁰

A coleta de espermatozoides a serem criopreservados pode ocorrer por masturbação ou por processos mais invasivos, quando necessário. Nos casos de azoospermia, para obtenção dos espermatozoides remanescentes no epidídimo ou no testículo são usadas várias técnicas, como a extração espermática por meio da retirada de pequenos fragmentos do epidídimo.¹² A desnecessária repetição de processos de coleta invasivos e dolorosos como esse é uma das vantagens da criopreservação, já que apenas uma coleta obtida diretamente do epidídimo é suficiente para ser criopreservada. Em longo prazo, pode-se dizer que a criopreservação pode diminuir custos e facilitar as técnicas de reprodução assistida.¹³

Outra vantagem que o processo oferece é em pacientes com doenças como câncer ou hepatite. Isso porque a fertilidade humana depende de uma maturação orquestrada das células espermáticas, bem como dos processos de meiose de maneira correta. Pacientes com essas doenças podem ter um desvio nessa maturação durante a formação dos gametas ou danificá-los após procedimentos como quimioterapia ou radioterapia.¹⁴ Essas pessoas podem ter a fertilidade preservada por meio da criopreservação dos seus espermatozoides sadios no momento certo.

Apesar dessas e de outras vantagens do uso da criopreservação, sabe-se que alguns processos de congelamento podem afetar o potencial de fertilidade em muitos aspectos, como no decréscimo da motilidade,¹⁵ na alteração na membrana celular,¹⁶ na diminuição na integridade do acrossomo¹⁷ e na indução da fragmentação de DNA.¹⁸ Assim, até que ponto a criopreservação pode influenciar na qualidade do sêmen colhido diretamente do epidídimo? Afinal, o processo oferece mais vantagens ou desvantagens? O objetivo deste trabalho é revisar a literatura sobre o impacto da criopreservação na qualidade do sêmen.

Método

Revisão da literatura sobre o impacto da criopreservação na qualidade do sêmen colhido diretamente do epidídimo por meio da observação dos seguintes parâmetros: taxa de gestação, taxa de aborto e características seminais, segundo Krüger et al. (1987).¹⁹ morfologia, motilidade, concentração e fragmentação do DNA entre o sêmen congelado e o fresco. Para tanto, foi feita estratégia de busca nas bases de dados Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) e Biblioteca Cochrane por meio das seguintes palavras-chaves: *sêmen*, *criopreservação*, *frozen sêmen*, *thawed sêmen* e *sêmen quality*. As pesquisas foram feitas tanto nos artigos e nas revisões disponíveis em *full text* como nos resumos.

Discussão

Ao analisar as taxas de gestação e de fertilização após injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) para verificar a influência da criopreservação, Kalsi et al. (2011)²⁰ compararam 493 pacientes. Para isso, usaram sêmen testicular fresco em 112 ciclos, sêmen testicular congelado em 43 ciclos, sêmen fresco do epidídimo em 279 ciclos e sêmen congelado do epidídimo em 59 ciclos. Para cada grupo, a etiologia da azoospermia apresentada, a azoospermia obstrutiva (AO) e a azoospermia não obstrutiva (ANO) foram consideradas. Posteriormente, as taxas de fertilização e de gestação foram determinadas para cada grupo.

Os resultados mostraram que o uso de sêmen congelado obtido do epidídimo na ICSI é tão confiável e favorável quanto o uso de sêmen fresco do epidídimo ($p = 0,35$). Porém, sugere-se que há uma maior taxa de gestação (39,5% versus 29,5%) e de nascimentos (55,8% versus 43%) para o sêmen testicular congelado do que fresco no caso de azoospermias obstrutivas ou não obstrutivas ($p = 0,047$). Isso pode ser ocasionado pelo fato de que esses pacientes tinham sêmen de melhor qualidade quando esse foi congelado.²⁰

O congelamento repetitivo do sêmen também tem influência na qualidade do gameta e a motilidade das amostras foi analisada para verificar essa influência.¹⁹ Dong et al. (2009)²¹ coletaram o sêmen diretamente do epidídimo de 16 indivíduos normais e oligospermicos e o congelaram em nitrogênio. Uma alíquota de cada amostra foi retirada para análise e o restante foi criopreservado novamente, sem remover o crioprotetor. Repetiu-se o processo várias vezes, até não haver mais espermatozoides móveis. A motilidade foi analisada após cada

congelamento e comparada entre os grupos. Observou-se que a motilidade dos espermatozoides foi mantida até o quinto congelamento para pacientes normospermicos e até o segundo congelamento para aqueles oligospermicos.²¹

Foi verificado também o efeito do congelamento/descongelamento do sêmen na fragmentação do DNA, na motilidade e na vitalidade. Thomson et al. (2010)²² analisaram 20 homens que apresentavam infertilidade e tiveram seu sêmen colhido do epidídimo congelado e descongelado três vezes, com lavagem ou não das amostras em cada ciclo e adição de crioprotetor a elas. A porcentagem de fragmentação de DNA aumentou significativamente após cada ciclo. No entanto, as amostras que não foram lavadas e não receberam crioprotetor depois de cada descongelamento apresentaram-se significativamente melhores. Em ambas a motilidade e a vitalidade diminuíram de forma constante após cada ciclo, mas a sobrevivência celular foi significativamente maior nas amostras não lavadas.²²

Com relação à influência isolada do tipo de congelamento e crioprotetor usados, Leibo et al. (2007)²³ demonstraram que o descongelamento rápido interfere negativamente bem menos do que o descongelamento lento e que o uso do crioprotetor glicerol na presença da gema de ovo é o método que mais favorece a motilidade do espermatozoide. Dessa forma, além da metodologia de criopreservação, a escolha do crioprotetor é determinante na viabilidade, qualidade e resistência seminal.²³

Nesse sentido, por meio dos resultados obtidos para motilidade espermática, capacitação, reação acrossômica e potencial de membrana mitocondrial (MMP), pesquisadores já desenvolveram a vitrificação de espermatozoides sem crioprotetores.²⁴ Isachenko et al. (2012)²⁴ relataram o nascimento de dois bebês saudáveis após a ICSI com o uso de espermatozoides móveis vitrificados. Os espermatozoides, em um dos casos com oligoastenoteratozoospermia, foram colhidos do epidídimo e congelados em palhetas com fluido tubário humano suplementado com 0,5% de albumina de soro humano e 0,25 M de sacarose. A motilidade espermática, capacitação, reação acrossômica e o MMP foram comparados entre espermatozoides frescos e vitrificados. Oito oócitos maduros foram microinjetados com os dois tipos de amostra. Embora a motilidade dos espermatozoides vitrificados fosse significativamente menor do que a dos espermatozoides frescos (60% versus 90%), não houve diferenças na porcentagem de capacitação e da reação acrossomal entre os dois tipos de espermatozoides, vitrificado e fresco (10% versus 8% e 5% versus 8%, respectivamente). No entanto, o MMP em espermatozoides vitrificados foi aparentemente prejudicado no ejaculado usado para ICSI em comparação com espermatozoides frescos (63% versus 96%).

Esses resultados sugerem que a vitrificação livre de crioprotetor permeável pode ser aplicada com sucesso em vários procedimentos de reprodução assistida, em particular na ICSI com espermatozoides móveis vitrificados, no qual se consegue uma gravidez normal até o nascimento. Foram estudadas por Ozkavukcu et al. (2008)²⁵ amostras de sêmen de 15 homens com fertilidade normal, obtidas diretamente do epidídimo, e avaliadas sua morfologia, motilidade e viabilidade por microscopia eletrônica. Os voluntários tinham idade média de 24,5 anos. As amostras foram liquefeitas por 45 minutos a 45°C.

Uma alíquota era imediatamente misturada a agentes crioprotetores e congelada para investigações futuras, enquanto outra alíquota era processada e avaliada. Dessa forma, antes e depois da criopreservação obtinham-se as características seminais, as quais eram comparadas entre si. A vitalidade foi determinada pelo método eosina-negrosina, que revelou 83% dessa característica antes do congelamento e 38% pós-congelamento. Com relação à morfologia, não houve mudança significativa na cabeça, na peça intermediária e no acrossomo. Por outro lado, houve aumento nas anormalidades de cauda, o que comprovou o custo da toxicidade osmótica e química dos crioprotetores pelo benefício da preservação da fertilidade.²⁵

Em outro estudo, a taxa de fertilização foi usada para verificar a influência do congelamento de pequeno número de espermatozoides ou do espermatozoide individual. A amostra colhida do epidídimo foi equilibrada em tampão crioprotetor e injetada com agulha de ICSI em uma gota de crioprotetor que continha a proporção 1:1 de plasma seminal e crioprotetor. Esse conteúdo foi armazenado em nitrogênio líquido. Os espermatozoides foram descongelados em banho de óleo a 37 °C, sem diluição e centrifugação. Para testar a capacidade de fertilização, os espermatozoides recuperados foram injetados por ICSI ou por FIV. Espermatozoides frescos a partir das mesmas amostras de sêmen serviram como controle. Após os ensaios, as taxas de fertilização para os espermatozoides frescos e congelados-descongelados foram de 67,6% (25/37) e 60,6% (40/66), respectivamente ($p = 0,052$). As taxas médias de clivagem nos grupos frescos e congelados-descongelados foram de 88% (22/25) e 85% (34/40), respectivamente ($p = 0,990$). Esse método de criopreservação para números pequenos ou individuais de espermatozoides humanos não apresentou influência na qualidade seminal entre amostras criopreservadas e frescas. Trata-se de técnica promissora para a aplicação em pacientes oligozoospermicos.²⁶

Muitos homens portadores de determinados cânceres do aparelho reprodutor necessitam, muitas vezes, de tratamentos que podem ser gonadotóxicos, o que leva ao questionamento de que a criopreservação poderia ser uma solução para eles. Hagenas et al. (2010)²⁷ estudaram 86 pacientes com câncer os quais tiveram seu sêmen colhido do epidídimo congelado antes de serem submetidos aos tratamentos ou procedimentos que pudessem prejudicar sua fertilidade. Todas as amostras foram analisadas antes da criopreservação quanto a volume, morfologia, motilidade e concentração. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, em palhetas de 0,5 ou 0,25 mL. Dos 86 pacientes, 71 tiveram sucesso na criopreservação do sêmen. Isso demonstra que, muitas vezes, esse pode ser o método de escolha para esses casos.²⁷

Alguns estudos demonstraram que outro fator interferente na criopreservação do sêmen é o próprio sêmen. Alguns indivíduos produzem ejaculados mais aptos e resistentes à criopreservação do que outros. Isso porque a criopreservação pode ter um profundo efeito na viabilidade e função do espermatozoide, por causa tanto das mudanças fisiológicas ocorridas no processo pela formação de cristais de gelo como dos efeitos do crioprotetor na composição da membrana espermática.²⁸ Dessa forma, a depender da qualidade do sêmen, muitas vezes selecionam-se apenas alguns candidatos à criopreservação.²⁹

Desde os anos 1960 os bancos de sêmen têm sido usados com muito sucesso na preservação da fertilidade masculina.¹³ Apesar dos possíveis danos que essa prática pode causar na qualidade seminal, várias pesquisas mostram que similares taxas de fertilização e gestação podem ser obtidas após ICSI com o uso de sêmen congelado ou fresco pós-coleta do epidídimo.³⁰

Em um futuro próximo, os efeitos tóxicos do congelamento tendem a ser contornados e restarão apenas os pontos positivos das técnicas, que ajudarão e atraindo ainda mais pacientes necessitados.

Conclusões

Modernas tecnologias têm sido desenvolvidas e usadas na reprodução humana assistida. Na criopreservação, seu uso resultou em maiores taxa de gestação e de nascimentos nos casos de azoospermias obstrutivas ou não obstrutivas, mais do que o uso de sêmen fresco para esse tipo de paciente. Com relação à motilidade espermática, somente o congelamento repetitivo diminui essa característica. Já a fragmentação de DNA aumenta significativamente após a criopreservação. Em se tratando de morfologia, a metodologia parece não ocasionar mudanças significativas na cabeça, na peça intermediária e no acrossomo; apenas anormalidades na cauda do espermatozoide. Com relação à taxa de nascimentos e de aborto, a criopreservação não interfere significativamente quando comparados sêmen fresco com congelado. Tais dados levam a inferir que a criopreservação, apesar de influenciar negativamente alguns parâmetros seminais, é uma ótima metodologia para a prolongação da fertilidade.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978;2(8085):366.
2. Van den Boogaard NM. Reproduction in the year 2012: in vivo or in vitro? *Ned Tijdschr Geneesk*. 2012;156(36):A4438.
3. Cipriano VTF, Mioranza A, Freitas GC, Lobo RB. Evaluation of seminal parameters in the indication of in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection in the treatment of the male factor fertility problem. *Reprod Clim*. 2010;25(3):104-9.
4. Mahadevan MM, Trounson AO, Leeton JF. The relationship of tubal blockage, infertility of unknown cause, suspected male infertility, and endometriosis to success of rkin vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*. 1983;40(6):755-62.
5. Guérin JF. Testicular tissue cryoconservation for prepubertal boy: indications and feasibility. *Gynecol Obstet Fertil*. 2005;33(10):804-8.
6. Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol*. 2003;170 4 Pt 1:1079-84.
7. Tournaye H, Devroey P, Camus M, Valkenburg M, Bollen N. Van Steirteghem AC. Zygote intrafallopian transfer or rkin vitork

- fertilization and embryo transfer for the treatment of male-factor infertility: a prospective randomized trial. *Fertil Steril*. 1992;58(2):344–50.
8. Walters EM. The history of sperm cryopreservation. In: Pacey AA, Tomlinson MJ, editors. *Sperm banking; theory and practice*. Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
 9. Zhmakin A. *Fundamentals of Cryobiology*. Berlin Heidelberg: Springer; 2009.
 10. Hossaim A, Nagaman M. Cryopreservation of male gametes. In: *Book infertility and assisted reproduction*. Cambridge: Cambridge University Press; 2008.
 11. Dohle GR, Dohle A, Jungwirth G, Colpi A, Giwercman T, Diemer TB, et al. Guidelines on male infertility. *European Association of Urology*; 2008.
 12. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *International braz j urol*. 2011;37(5):570–83.
 13. Sherman JK. Low temperature research on spermatozoa and eggs. *Cryobiology*. 1964;1(2):103–29.
 14. Anderson RA. Fertility preservation techniques: laboratory and clinical progress and current issues. *Reproduction*. 2008;136(6):667–9.
 15. Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH. Cryopreservation of human semen. Comparison of cryopreservatives, sources of variability, and prediction of post-thaw survival. *J Androl*. 1992;13(3):283–8.
 16. Esteves SC, Sharma RK, Thomas-Jr AJ, Agarwal A. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. *International Braz J Urol*. 2007;33(3):364–74.
 17. Cross NL, Hanks SE. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Hum Reprod*. 1991;6(9):1279–83.
 18. De Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N, Cedenho AP. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertil Steril*. 2006;86(3):597–600.
 19. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Veeck LL, et al. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human *in vitro* fertilization. *Urology*. 1987;30(3):248–51.
 20. Kalsi J, Thum MY, Muneer A, Pryor J, Abdullah H, Minhas S. Analysis of the outcome of intracytoplasmic sperm injection using fresh or frozen sperm. *BJU Int*. 2011;107(7):1124–8.
 21. Dong Q, Hill D, Van de Voort CA. Interactions among pre-cooling, cryoprotectant, cooling, and thawing for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Cryobiology*. 2009;59(3):268–74.
 22. Thomson LK, Fleming SD, Barone K, Zieschang JA, Clark AM. The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril*. 2010;93(4):1147–56.
 23. Leibo SP, Kubisch HM, Schramm RD, Harrison RM, VandeVoort CA. Male-to-male differences in post-thaw motility of rhesus spermatozoa after cryopreservation of replicate ejaculates. *J Med Primatol*. 2007;36(3):151–63.
 24. Isachenko V, Isachenko E, Petrunkina AM, Sanchez R. Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies. *Reprod Fertil Dev*. 2012;24(2):323–6.
 25. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseynoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 2008;25(8):403–11.
 26. Peng QP, Cao SF, Lyu QF, Xue SG, Jin W, Liu XY, et al. A novel method for cryopreservation of individual human spermatozoa. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2011;47(8):565–72.
 27. Hagenas I, Jorgensen N, Rechnitzer C, Sommer P, Holm M, Schmiegelow K, et al. Clinical and biochemical correlates of successful semen collection for cryopreservation from 12–18 year old patients: a single center study of 86 adolescents. *Human Reprod*. 2010;25(8):2031–8.
 28. Suarez SS. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod Fertil Dev*. 2007;19(1):103–10.
 29. Morrell JM, Rodrigues-Martinez H. Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Vet Med Int*. 2011, <http://dx.doi.org/10.4061/2011/894767>.
 30. Kuczynski W, Dhont M, Grygoruk C, Grochowski D, Wolczynski S, Szamatowicz M. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa – A prospective randomized study. *Hum Reprod*. 2001;16(10):2109–13.