

Efectos de la descongelación-lavado sobre la motilidad, vitalidad y morfología de espermatozoides de baja calidad

Jorge Oliva-Hernández^a y Mercedes Marcos-González^b

^a*Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Tabasco. México.*

^b*Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario La Paz. Madrid. España.*

RESUMEN

Objetivos: El objetivo de este estudio, fue evaluar los efectos de 3 diferentes protocolos de descongelación, así como de la aplicación del lavado, sobre la vitalidad, motilidad y morfología de la cola del espermatozoide en muestras de semen de baja calidad.

Material y métodos: Se seleccionaron 13 muestras de semen de baja calidad de acuerdo con los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud. Las muestras fueron descongeladas de acuerdo a los siguientes protocolos: *a)* 25 min a temperatura ambiente; *b)* 15 min a temperatura ambiente seguido de 10 min a 37 °C, y *c)* 5 min a 4 °C seguido por 10 min a temperatura ambiente y 10 min a 37 °C. Para estudiar el efecto del lavado, todas las muestras descongeladas se evaluaron antes y después de éste. Se analizaron 2 píldoras (150 µl píldora⁻¹) de semen congelado por cada protocolo de descongelación y se evaluaron el índice de vitalidad, la motilidad activa y las alteraciones en la morfología de la cola del espermatozoide.

Resultados: Los resultados obtenidos muestran que el protocolo de descongelación no mostró efecto alguno ($p > 0,05$) sobre ninguna de las variables estudiadas. Sin embargo, el lavado redujo ($p < 0,001$) los índices de vitalidad, motilidad activa y aumentó ($p < 0,001$) el porcentaje de alteraciones en la morfología de la cola.

Conclusiones: Estos resultados indican que el lavado más que el protocolo de descongelación, reduce la vitalidad de los espermatozoides en semen de baja calidad.

Palabras clave: Criopreservación. Varones infériles. Espermatozoide. Morfología de la cola del espermatozoide.

ABSTRACT

Effects of the release-wash on the motility, vitality and morphology of sperms of low quality

Objectives: The aim of this study was to evaluate the effects of 3 different thawing procedures, as well as the effect of washing, on vitality, motility and sperm tail morphology from poor quality semen samples.

Material and methods: Thirteen poor quality semen samples were selected from different patients according to the parameters provided by the World Health Organization. Samples were thawed according to the following protocols: *a)* 25 min at room temperature; *b)* 15 min at room temperature followed by 10 min at 37 °C; *c)* 5 min at 4 °C followed by 10 min at room temperature and 10 min at 37 °C. In order to study the washing effects all thawed samples were evaluated before and after the washing procedure. Two pellets (150 µl pellet⁻¹) were analyzed for each thawing protocol and vitality, motility and sperm tail morphological alterations were evaluated.

Results: The results obtained showed that the thawing protocol did not show any effect ($p > .05$) on none of the evaluated characteristic. However, washing resulted in decreased ($p < .001$) vitality, active motility, increased morphological sperm tail alterations ($p < .001$).

Conclusions: These results suggest that washing rather than the thawing procedure could reduce sperm viability in poor quality sperm.

Key words: Cryopreservation. Infertile men. Spermatozoa. Sperm tail morphology.

Correspondencia: Dr. J. Oliva-Hernández.

Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

Km 1 carretera Huimanguillo-Cárdenas. Huimanguillo, 86400 Tabasco. México.

Correo electrónico: olivajh20@yahoo.com.mx

INTRODUCCIÓN

La congelación de semen es una alternativa para almacenar espermatozoides (viables y con capacidad de fertilizar un ovocito) en los pacientes que serán sometidos a uno de los siguientes procesos: orquitectomía (uni o bilateral), quimioterapia, radioterapia y vasectomía¹⁻³. Con excepción de los casos de vasectomía, es frecuente que el semen de este tipo de pacientes muestre una baja calidad seminal, medida a través de la movilidad y/o concentración de espermatozoides. La situación anterior, requiere considerar, por una parte, el efecto deletéreo per se de la congelación sobre los espermatozoides⁴⁻⁷ y, por otra, la reducción en viabilidad, motilidad y capacidad fertilizante que muestran los espermatozoides durante el proceso de descongelación^{4,5,8}.

El proceso de congelación de semen ha sido ampliamente estudiado y en su conjunto la metodología está bien protocolizada^{9,10}. Sin embargo, en el caso de la descongelación, es necesario aclarar la participación de diversos factores como temperatura de descongelación (constante 37 °C o con cambios graduales 4, 20 y 37 °C), velocidad de descongelación (lenta frente a rápida) y velocidad con la que se congeló (lenta, rápida) sobre la motilidad, vitalidad y morfología de los espermatozoides.

En varones normozoospérmicos la motilidad de los espermatozoides posdescongelación se reduce hasta en un 51% con respecto a la motilidad mostrada previamente a la congelación⁴. En el caso de pacientes astenozoospérmicos, la magnitud en la reducción de la motilidad después de someter a los espermatozoides al proceso congelación-descongelación resulta mayor con respecto a lo detectado en pacientes normozoospérmicos⁷. De ahí, la importancia de contar con protocolos de descongelación que minimicen los efectos deletéreos propios del proceso congelación-descongelación-lavado.

La vitalidad de los espermatozoides expuestos al proceso de congelación-descongelación se reduce hasta en un 14% en varones normozoospérmicos⁴, esta perdida en vitalidad puede ser mayor en muestras seminales que previamente a su congelación muestran una reducida vitalidad (p. ej., < 70%) y motilidad activa (p. ej., < 50%).

Se ha reportado¹¹ que durante el proceso de descongelación de semen se incrementa la proporción de espermatozoides con colas con aspecto enrollado; una cola alterada en su morfología (p. ej., enrollamiento) dificulta el movimiento del espermatozoide e influye en el tipo de motilidad que muestran los espermatozoides, de ahí que resulte importante que el método de descongelación utilizado produzca el mínimo de

alteraciones en la morfología de la cola de los espermatozoides.

Considerando lo señalado previamente, el objetivo de este estudio fue, partiendo de muestras seminales de mala calidad, establecer la influencia de los diferentes pasos efectuados durante la descongelación sobre la muestra seminal, para seleccionar la metodología que menos afecte a los espermatozoides en su vitalidad, motilidad y morfología de la cola.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de semen

Se utilizaron muestras seminales provenientes de 13 eyaculados obtenidos por masturbación y de diferentes pacientes con astenozoospermia. El promedio de edad de los varones fue $33 \pm 1,4$ años (media \pm error estándar). Los eyaculados se evaluaron en forma previa a su congelación, y en promedio presentaron las siguientes características seminales: *a*) volumen $5,1 \pm 0,6$ ml; *b*) pH $8,1 \pm 0,07$ (tira reactiva de papel; Merck®); *c*) una concentración de $52 \pm 14 \times 10^6$ espermatozoides ml⁻¹ (cámara de Makler); *d*) una concentración de $246 \pm 68 \times 10^6$ espermatozoides eyaculado⁻¹; *e*) índice de vitalidad $57 \pm 4\%$ (naranja de acridina¹²); *f*) motilidad total y activa de 40 ± 3 y $29 \pm 3\%$, respectivamente; *g*) índice de madurez nuclear de los espermatozoides: maduros $77 \pm 1\%$, intermedios $7,0 \pm 0,4\%$ e inmaduros $16 \pm 1\%$ (test de condensación de la cromatina espermática: tinción azul de anilina¹³, *h*) y espermatozoides con morfología normal $12 \pm 1\%$ (tinción panóptico rápido modificada^{11,14}).

Manejo del semen previo a la congelación

Una vez determinada la concentración de espermatozoides, se colocó en un tubo cónico (15 ml, Falcon®) una muestra de semen en estado de licuefacción con un mínimo de 20×10^6 de espermatozoides para su congelación.

Congelación de semen

El semen se congeló en píldoras¹⁰. Con anterioridad a su congelación, se permitió que el semen estuviera en estado de licuefacción, posteriormente se homogenizó; cada muestra seminal se diluyó 1:1 (volumen/volumen) con un crioprotector (SpermFreeze®; Beernem, Bélgica), la concentración final del crioprotector fue del 7,5%. La muestra por congelar (semen más crioprotector) se mezcló manualmente en forma suave

y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min; posteriormente, el tubo con la muestra se introdujo en un recipiente con agua a temperatura ambiente durante 15 min (estabilización).

El descenso de temperatura fue lento; para ello se colocó el tubo con la muestra por congelar (dentro del recipiente con agua) a una temperatura entre 4 y 5 °C durante 60 min. El siguiente descenso de temperatura se logró al colocar 150 μ l de muestra por congelar en la superficie de bloques de CO₂; una vez congeladas y formadas las píldoras, éstas fueron retiradas del bloque de CO₂ y se introdujeron en un criotubo (6 píldoras por criotubo); de forma inmediata, cada criotubo se sumergió en nitrógeno líquido. Las muestras seminales se mantuvieron en congelación hasta el momento de su estudio por un mínimo de 48 h.

Tratamientos

De un total de 6 píldoras por paciente, se asignaron 2 píldoras por tratamiento: *a*) descongelación en 1 paso: este tratamiento se consideró como control y consistió en colocar las píldoras en un tubo cónico (15 ml) para su descongelado a temperatura ambiente (20 °C) durante 25 min. El tubo se frotó manualmente 2 veces (en forma breve y con la palma de ambas manos) a los minutos 15 y 25 de iniciado el proceso de descongelación con el propósito de favorecer un descongelado homogéneo; *b*) descongelación en 2 pasos. Consistió en descongelar las píldoras a temperatura ambiente durante 15 min y, posteriormente, a 37 °C durante 10 min. El tubo se frotó manualmente (tal como se detalló en el tratamiento “a”, a los minutos 5 y 15 de iniciado el proceso de descongelación, y *c*) descongelación en 3 pasos. Consistió en descongelar las píldoras a 4 °C durante 5 min seguido de temperatura ambiente durante 10 min y 37 °C durante 10 min. El tubo se frotó manualmente a los minutos 5 y 15. En este protocolo, descongelar a 4 °C implicó colocar el tubo (con las píldoras dentro de éste) en un vaso de precipitado con agua a 4 °C; el nivel empleado de agua (50 ml) permitió cubrir las píldoras por descongelar.

Medio de lavado. Una hora previa a la descongelación, se colocó en la estufa (37 °C, 5% CO₂) un tubo cónico (15 ml, Falcón®) con medio de lavado Game-te® (Vitrolife, Gethenburg, Suecia), aproximadamente 1,5 ml por cada par de píldoras, con el fin de equilibrar y mantener estable el pH del medio de lavado.

Lavado de la muestra seminal. Una vez efectuada la descongelación de la muestra seminal (minuto 25), se tomaron 3 alícuotas (2 de 15 μ l y una de 40 μ l) para llevar a cabo la primera evaluación de la muestra semi-

nal (antes del lavado). Al resto de la muestra se le agrego 1 ml de medio de lavado y se centrífugo a 360 g durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 100 μ l de medio de lavado para su evaluación poslavado.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño de 2 factores con medidas repetidas sobre ambos¹⁵. El primer factor de estudio correspondió al protocolo de descongelación de las píldoras de semen: *a*) 25 min a temperatura ambiente; *b*) 15 min a temperatura ambiente seguido de 10 min a 37 °C, y *c*) 5 min a 4 °C seguido de 10 min a temperatura ambiente y 10 min a 37 °C. El segundo factor fue el momento de evaluación de la muestra seminal dentro del proceso de lavado: *a*) antes del lavado, y *b*) después del lavado.

Unidad experimental

Correspondió a 2 píldoras (150 μ l píldora⁻¹) de semen congelado.

Variables evaluadas

Las variables se evaluaron en 2 momentos: una vez que se habían descongelado las píldoras y después del lavado de la muestra descongelada (centrifugación y lavado).

Motilidad activa

Se evaluó de forma subjetiva a través de la observación directa de 200 espermatozoides a 40 \times utilizando un microscopio de contraste de fases (Labophot, Nikon®). Se utilizaron 2 patrones de motilidad, G₃ y G₂¹⁶.

Índice de vitalidad

En 200 espermatozoides, se cuantificó la proporción de espermatozoides vivos y muertos por el uso de un microscopio de fluorescencia (Transformer, UN, con filtro primario de 495 nm y filtro secundario de 500 nm, Nikon®). Se utilizó la tinción naranja de acridina¹² para diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos; los vivos muestran fluorescencia verde y los muertos fluorescencia naranja.

Alteraciones en la morfología de la cola

La morfología de la cola fue evaluada a 1.000 \times en 100 espermatozoides teñidos con la tinción panóptico rápido modificada¹¹; todas las morfologías de cola fueron clasificadas por un solo observador. La morfo-

logía de la cola se clasificó en 4 categorías: *a*) cola normal; *b*) cola corta; *c*) cola enrollada parcialmente, y *d*) cola enrollada totalmente. Una cola normal se definió como la que no presentó enrollamiento parcial o total a lo largo de su extensión; la cola corta, es la que muestra un mayor grosor y una menor longitud con respecto al detectado en la cola normal; la cola enrollada parcialmente, se refiere a la que muestra un enrollamiento parcial en su extremo distal (sin llegar a ser total); la cola enrollada totalmente, es el tipo de cola que está enrollada alrededor de la cabeza del espermatozoide.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm error estándar y previamente se les aplicó la prueba de Shapiro-Wilk's para probar que se distribuyen en forma normal; las variables que no se distribuyeron en forma normal fueron transformados a la raíz cuadrada (motilidad activa) y logaritmo en base 10 (porcentaje de colas enrolladas parcialmente y totalmente). Los datos se analizaron utilizando un análisis de varianza a través de los modelos lineales generales para el diseño descrito¹⁷.

RESULTADOS

Efecto del protocolo de descongelación

El protocolo de descongelación no influyó ($p > 0,05$) sobre las siguientes variables: índice de vitalidad, motilidad total, motilidad activa, espermatozoides con cola normal, espermatozoides con cola corta, espermatozoides con cola enrollada parcialmente y espermatozoides con cola enrollada totalmente (tabla 1).

Efecto del lavado

Todas las variables estudiadas fueron influidas por el proceso de lavado. Después del lavado de la muestra seminal, las variables índice de vitalidad, motilidad total, motilidad activa, espermatozoides con cola normal y espermatozoides con cola normal y corta se redujeron ($p < 0,001$) con respecto a los valores presentes antes del lavado. En el caso de los espermatozoides con cola enrollada parcialmente ($p < 0,001$) y totalmente ($p < 0,01$) se registró un aumento (tabla 2).

Efecto del protocolo de descongelación y lavado de la muestra seminal

La interacción protocolo de descongelación con lavado no resultó significativa ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

El proceso de congelación-descongelación reduce el porcentaje de espermatozoides vivos, tanto en muestras seminales de buena calidad, normozoospérmicas, como en las de mala calidad, astenozoospérmicas, oligozoospérmicas y teratozoospérmicas¹⁸⁻²⁰. Sin embargo, al presentarse desde un inicio en las muestras seminales de baja calidad, una vitalidad baja, cualquier reducción adicional en este parámetro compromete sus posibilidades de uso con alguna de las tecnologías de reproducción asistida disponibles.

En el presente estudio, los protocolos propuestos para descongelar semen de mala calidad no mostraron un efecto ($p > 0,05$) sobre el índice de vitalidad de los espermatozoides. Se detectó que el proceso de congelación-descongelación reduce el índice de vitalidad de los espermatozoides en un 56% con respecto al valor registrado previo al proceso de congelación. Los valores de vitalidad posdescongelación en las muestras seminales estudiadas resultaron similares a lo detectado en otros estudios^{18,20}, en donde se estudió el efecto del proceso de congelación-descongelación sobre la vitalidad de muestras seminales de baja calidad.

El proceso de descongelación de muestras seminales debe reducir el desequilibrio osmótico y la recristalización de microcristales de agua intracelular que pueden dañar las estructuras celulares¹⁰. Los resultados de este estudio indican que los protocolos de descongelación evaluados afectan de manera similar la vitalidad de los espermatozoides, lo que sugiere que el cambio gradual de la temperatura de almacenamiento (-196°C) a la temperatura de evaluación (teniendo constante el tiempo de descongelación) no reduce el porcentaje de espermatozoides muertos. A diferencia de lo indicado en este estudio, otros autores²¹ muestran que cuando una muestra seminal normozoospérmica se enfria a una tasa baja ($1^{\circ}\text{C min}^{-1}$), la función mitocondrial de los espermatozoides (variable asociada con la vitalidad de los espermatozoides) resulta mayor si la tasa de calentamiento de la muestra seminal también es baja ($1^{\circ}\text{C min}^{-1}$) en lugar de alta ($400^{\circ}\text{C min}^{-1}$). Mientras que si la tasa de enfriamiento es alta (entre 175 y $800^{\circ}\text{C min}^{-1}$) y la de calentamiento alta ($400^{\circ}\text{C min}^{-1}$), se obtiene un mayor porcentaje de espermatozoides con función mitocondrial con respecto a una tasa de calentamiento baja ($1^{\circ}\text{C min}^{-1}$).

Convencionalmente, las muestras de semen que se someten al proceso de congelación contienen plasma seminal, un medio de nutrientes (como citrato-yema de huevo o albúmina sérica humana) y glicerol. Las muestras seminales congeladas que se requieran utilizar para alguna de las técnicas de reproducción asistida

TABLA 1. Efectos de la descongelación sobre la motilidad, vitalidad y morfología de espermatozoides de baja calidad

Variables, en %	Protocolo de descongelación		
	Temperatura ambiente (media ± error estándar)	Temperatura ambiente +37 °C (media ± error estándar)	4 °C + temperatura ambiente +37 °C (media ± error estándar)
Muestras seminales clasificadas como astenozoospérmicas (n = 13)			
Índice de vitalidad	25,0 ± 2,3	24,6 ± 2,2	25,4 ± 2,6
Motilidad			
Total	8,4 ± 1,3	8,5 ± 1,4	9,1 ± 1,4
Rápida y rectilínea	2,9 ± 0,6	3,3 ± 0,9	3,4 ± 0,6
Activa	5,5 ± 1,0	5,4 ± 1,1	5,7 ± 1,0
Morfología de la cola del espermatozoide			
Normal	54,9 ± 2,8	55,2 ± 1,1	53,4 ± 2,5
Corta	17,8 ± 1,6	18,5 ± 2,8	18,0 ± 1,4
Enrollada parcialmente	24,2 ± 2,8	23,3 ± 3,0	24,9 ± 2,6
Enrollada totalmente	3,2 ± 0,7	3,0 ± 0,6	3,7 ± 0,9

Medias en el mismo renglón son similares (p > 0,05).

TABLA 2. Efecto del lavado sobre la motilidad, vitalidad y morfología de espermatozoides de baja calidad

Variables, en %	Etapa del proceso de lavado	
	Antes (media ± error estándar)	Después (media ± error estándar)
Muestras seminales clasificadas como astenozoospérmicas (n = 13)		
Índice de vitalidad	28,8 ± 1,9 ^a	21,2 ± 1,7 ^b
Motilidad		
Total	11,0 ± 1,2 ^a	6,3 ± 0,8 ^b
Rápida y rectilínea	3,9 ± 0,7 ^a	2,5 ± 0,4 ^b
Activa	7,1 ± 1,0 ^a	4,0 ± 0,6 ^b
Morfología de la cola del espermatozoide		
Normal	62,7 ± 1,7 ^a	46,3 ± 1,7 ^b
Corta	21,3 ± 1,2 ^a	14,8 ± 1,0 ^b
Enrollada parcialmente	13,6 ± 1,2 ^a	34,7 ± 1,7 ^b
Enrollada totalmente	2,4 ± 0,4 ^c	4,2 ± 0,7 ^d

Medias con diferente superíndice (a, b) en el mismo renglón indican diferencia significativa (p < 0,001). Medias con diferente superíndice (c, d) en el mismo renglón indican diferencia significativa (p < 0,01).

da (fecundación *in vitro* o inyección intracitoplasmática del espermatozoide) deberán ser descongeladas y lavadas, este último proceso se realiza con el fin de retirar el plasma seminal, el crioprotector y contaminantes, ya que éstos interfieren con el proceso de fecundación²⁰.

En este estudio, la etapa del proceso de lavado influyó sobre el índice de vitalidad de los espermatozoides. Durante el proceso de lavado de la muestra descongelada se disminuyó el índice de vitalidad en un 26%. Por lo que el proceso de congelación-descongelación tiene un mayor efecto deletéreo sobre los espermatozoides que el proceso de lavado posdescongelación.

Con respecto a la motilidad, los resultados de este estudio indican que los protocolos de descongelación estudiados redujeron la motilidad de los espermatozoides en al menos un 77% con respecto a la motili-

dad de los espermatozoides previa a su congelación. Una reducción en la motilidad (muestra seminal fresca frente a descongelada) ligeramente inferior a la indicada en este estudio ha sido reportada previamente⁷ en muestras seminales de varones catalogados como infériles.

En el presente estudio no se evaluó la tasa de calentamiento (°C min⁻¹) de una muestra congelada. Sin embargo, al mantenerse constante el tiempo de descongelación de la muestra seminal (25 min) y diferir la temperatura de calentamiento entre los protocolos de descongelación propuestos, se asume que la tasa de calentamiento difiere entre tratamientos. No obstante, los diversos protocolos de descongelación estudiados afectaron de manera similar la motilidad de los espermatozoides (total, G3 y activa). Estos resultados no concuerdan con hallazgos previos²¹, donde se contrastaron 2 temperaturas de calentamiento de la mues-

tra seminal congelada (1 frente a 400 °C min⁻¹) y se indica una interacción significativa entre la temperatura de enfriamiento y la temperatura de calentamiento, es decir, la motilidad de los espermatozoides posdescongelación resulta mayor cuando se utilizan una tasa de enfriamiento baja con una tasa baja de calentamiento. Al parecer, se requiere contrastar diferencias marcadas en las tasas de calentamiento para detectar cambios en la motilidad de los espermatozoides.

De manera similar a los hallazgos en el índice de vitalidad, la etapa del proceso de lavado afectó la motilidad de los espermatozoides, sin que este efecto fuera de mayor magnitud al ejercido por el proceso de descongelación. El proceso de lavado implica someter a los espermatozoides a la dilución en medios de cultivo, seguido de la centrifugación y resuspensión en medios de cultivo. La dilución se realiza con un gran volumen de medio de cultivo y la centrifugación tiene como fin concentrar una población de espermatozoides previamente diluida. Una consecuencia del lavado de la muestra seminal 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^{21,22}.

El proceso de congelación de los espermatozoides produce cambios en la morfología espermática, incluyendo daño en las mitocondrias, el acrosoma y la cola del espermatozoide^{23,24}. Los cambios morfológicos en la cabeza y en la pieza intermedia de los espermatozoides provenientes de pacientes infériles se han descrito previamente^{21,23,24}, y hay limitada información acerca de los cambios que ocurren en la morfología de la cola del espermatozoide^{11,23}.

La criopreservación causa rotura de la membrana plasmática en la cabeza y regiones de la cola del espermatozoide. El daño ocasionado por la congelación en la membrana plasmática de la cabeza y la cola puede ocurrir de manera independiente; la presencia de una membrana intacta en la cola no necesariamente indica que la membrana de la cabeza también está intacta²³. Los diferentes protocolos de descongelación evaluados en este trabajo no ejercieron efecto sobre la morfología de la cola del espermatozoide. Del total de las colas evaluadas, solo el 54% se clasificó como normal, destacando la cola enrollada parcialmente (24%) como una de las alteraciones que se registran tras el proceso de congelación-descongelación. Los resultados del presente trabajo apoyan resultados previos de estudios¹¹ en donde se indica que el proceso de descongelación de semen incrementa la proporción de espermatozoides con colas con aspecto enrollado.

El proceso de lavado redujo en un 26% la presencia de espermatozoides con una morfología de la cola normal. Destacando el incremento (255%) en el por-

centaje de colas enrolladas parcialmente posterior al lavado. Lo que 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 plasmática²¹⁻²³ sino en la alteración de la morfología de la cola, la cual resulta determinante para la calidad del movimiento del espermatozoide.

Se concluye que las diferencias en los protocolos de descongelación evaluados no influyeron en las variables estudiadas. Sin embargo, es de resaltar la reducción que se observó en la motilidad, vitalidad e incremento en las alteraciones en la morfología de la cola producida por el lavado de la muestra una vez descongelada.

Bibliografía

1. Jequier AM. Vasectomy related infertility: a major and costly medical problem. *Hum Reprod*. 1998;13:1757-9.
2. Tournaye H, Goossens E, Verheyen G, Fredericks V, De Block G, Devroey P, et al. Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects. *Hum Reprod Update*. 2004;10:525-32.
3. Walschaerts M, Muller A, Daudin M, Hennebicq S, Huyghe E, Thonneau P. Sperm cryopreservation: recent and marked increase in use for testicular cancer compared with Hodgkin's disease. *J Androl*. 2007;28:801-3.
4. Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. I. Effects of holding procedure and seeding on motility, fertilizability and acrosome reaction. *Fertil Steril*. 1987;47:656-63.
5. Critser JK, Arneson BW, Aaker DV, Huse-Benda AR, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. II. Postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril*. 1987;47:980-4.
6. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril*. 2001;76:892-900.
7. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod*. 2001;16:1191-9.
8. Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril*. 1988;50:314-20.
9. Pardo M. Crioconservación de esperma humano. Bancos de Semen. En: Pomerol Monseny JM, Arondo Arondo JL, editores. Práctica andrológica. Barcelona: Masson-Salvat Medicina; 1994; p. 381-4.
10. Caballero P, Núñez R, Vázquez I. Técnicas de congelación y descongelación del semen. En: Pellicer A, Bonilla-Musoles F, Cano A, Crespo J, De los Santos MJ, Gil-Salom M, et al, editores. Valencia: Instituto Valenciano de Infertilidad y Facultad de Medicina, Universidad de Valencia. Cuadernos de Medicina Reproductiva. 1995;1:87-106.
11. Montufo S, Arroyo M, Marcos M. Influencia de la fecha de caducidad del medio de congelación sobre la criopreservación espermática. Memoria del XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patológica Molecular. 3-5 octubre 2001; Cáceres, España.
12. Andolz P, Bielsa MA. Examen microscópico. Parte Primera. En: Semen Humano. Manual y Atlas. Asociación Española de Farmacéuticos Analistas. Madrid: Garsi, S.A.; 1995.
13. Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *International J Androl*. 1990;13:452-62.
14. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. World Health Organization. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.

15. Cody RP, Smith JK. Repeated measures designs. En: Applied statistics and the SAS Programming Language. 3rd ed. New Jersey: Prentice Hall; 1991.
16. Pomerol JM. Asteno y teratozoospermia. En: Pomerol Monseny JM, Arondo Arondo JL, editores. Práctica andrológica. Barcelona: Masson-Salvat Medicina; 1994. p. 51-9.
17. SAS. Statistical Analysis System, User. SAS Institute, Cary, N.C. USA. 1999.
18. Hammadeh ME, Greiner S, Rosenbaum P, Schmidt W. 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. *J Androl.* 2001;22:1012-8.
19. Hammadeh ME, Szarvasy D, Zeginiadou T, Rosenbaum P, Georg T. Evaluation of cryoinjury of spermatozoa after slow (programmed biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze-thawing techniques. *J Assist Reprod Genet.* 2001;18:364-70.
20. Bandularatne E, Bongso A. Evaluation of human sperm function after repeated freezing and thawing. *J Androl.* 2002;23:242-9.
21. Henry MA, Noiles EE, Gao D, Mazur P, Critser JK. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effect of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertil Steril.* 1993;60:911-8.
22. Wooley DM, Richardson DW. Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *J Reprod Fertil.* 1978;53:389-94.
23. Zhu WJ, Liu XG. Cryodamage to plasma membrane integrity in head and tail regions of human sperm. *Asian J Androl.* 2000;2:135-8.
24. O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod.* 2002;17:704-9.