

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES
CRIOPRESERVADOS MEDIANTE CONGELACIÓN LENTA VS
VITRIFICACIÓN EN MICROGOTAS**

Por

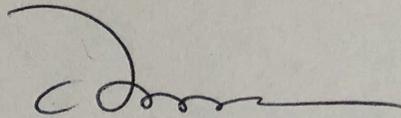
DRA. LORENA CHRISSIE OCEGUERA PALAO

**Como requisito para obtener el Grado de
SUBESPECIALISTA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**

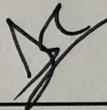
FEBRERO, 2022

**EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES
CRIOPRESERVADOS MEDIANTE CONGELACIÓN LENTA VS
VITRIFICACIÓN EN MICROGOTAS**

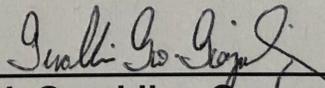
Aprobación de la tesis:



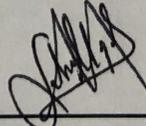
Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Director de Tesis
Profesor del Departamento de Ginecología y Obstetricia
Subdirector de Estudios de Posgrado



Dr. Med. Abel Guzmán López
Jefe del Departamento de Ginecología y Obstetricia



Dr. Sci. Geraldina Guerrero González
Coordinadora de Investigación
Departamento de Ginecología y Obstetricia



Dra. Selene Marysol García Luna
Co-Asesor de Tesis
Coordinadora del Laboratorio de Biología de la Reproducción

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de estar viva y poder realizar esta subespecialidad tan gratificante que me llena de satisfacción día con día.

Por darme el mejor apoyo y la mejor guía a través de los años, mi mamá Cristina Palao, a quien le debo la persona que soy, quien ha estado conmigo en cada momento a pesar de la distancia.

A mis hermanas, por ser un apoyo incondicional.

Cristina y Marina gracias por siempre creer en mí.

A mi Hospital Universitario, por todas sus enseñanzas de médicos (Dr. Otto Valdez, Dr. González Baez, Dr. Manuel, Dr. Sordia), enfermeras de esta institución (Toñita, Margarita) de alguna manera cada uno de ellos ha contribuido en mi formación, y me han hecho ser un mejor médico.

A mis maestros por su empeño y dedicación.

Muy en especial al Dr. Arturo Morales por aceptarme para realizar la tesis bajo su dirección, gracias por la confianza y apoyo.

Dra. Selene García, no hay palabras para expresar el agradecimiento que siento, gracias por la entrega, tiempo y disponibilidad, así como por guiarme en el desarrollo de mi tesis.

QFB, Lilith Villareal, gracias por todo el apoyo, por compartir conmigo tu pasión en el laboratorio, por enseñarme y principalmente por creerme en mi.

Finalmente que más puedo decir gracias por ser más que una compañera, una amiga.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
CAPITULO I	
1. RESUMEN	
CAPITULO II	
2. INTRODUCCION.....	
2.1 Infertilidad	
2.2 Criopreservación.....	
2.3 Métodos convencionales de crio preservación.....	
2.4 Vitrificación	
2.5 Medios de congelación	
CAPITULO III	
3. JUSTIFICACION.....	
CAPITULO IV	
4. PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	
CAPITULO V	
5. HIPOTESIS.....	
5.1 Hipótesis nula	
5.2 Hipótesis alterna.....	
CAPITULO VI	
6. OBJETIVOS.....	
6.1 Objetivo general.....	
6.2 Objetivos secundarios	
CAPITULO VII	
7. MATERIAL Y METODOS	
7.1 Procedimiento.....	
7.2 Calculo muestral	
7.3 Análisis estadístico	

7.4 Comité de ética.....	
CAPITULO VIII	
8. RESULTADOS	
CAPITULO IX	
9. DISCUSION.....	
CAPITULO X	
10. CONCLUSION.....	
CAPITULO XI	
11. ANEXOS.....	
11.1 Aprobación del comité de ética en investigación.....	
11.2 Cuestionario de congelación de esperma	
CAPITULO XII	
12. BIBLIOGRAFIA.....	
CAPITULO XIII	
13. RESUMEN AUTOBIBLIOGRAFICO.....	
CAPITULO XIV	
14. ABSTRACT.....	

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Características descriptivas de los participantes	24
Tabla 2. Comparación múltiple de la recuperación de espermatozoides usando Freezing Medium TYB	28
Tabla 3. Comparación múltiple de la recuperación de espermatozoides usando Sperm Freezing Medium	29
Tabla 4. Comparación múltiple de la recuperación de espermatozoides usando Freezing Medium TYB en muestras con normozoospermia.....	30

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Estrategia general de estudio	21
Figura 2. Parámetros espermáticos iniciales	26
Figura 3. Clasificación de las muestras según su concentración	28
Figura 4. Diferencia en la concentración espermática recuperada utilizando los 2 medios comerciales	30
Figura 5. Diferencia entre las medias de la concentración de espermatozoides inicial respecto a la concentración de espermatozoides recuperados según los 3 métodos de congelación utilizando el medio Freezing Medium TYB	31
Figura 6. Diferencia entre las medias de la concentración de espermatozoides inicial respecto a la concentración de espermatozoides recuperados según los 3 métodos de congelación utilizando el medio Sperm Freezing Medium.....	32
Figura 7. Motilidad total de espermatozoides recuperados utilizando los 2 medios de congelación comerciales.....	33
Figura 8. Comparación múltiple de la motilidad total recuperada de los 3 métodos de congelación utilizando el medio Freezing Medium TYB	34
Figura 9. Comparación múltiple de la motilidad total recuperada de los 3 métodos de congelación utilizando el medio Sperm Freezing Medium.....	35
Figura 10. Motilidad progresiva de los espermatozoides recuperados utilizando los 2 medios de congelación comerciales	36
Figura 11. Comparación múltiple de la motilidad progresiva recuperada de los 3 métodos de congelación utilizando el medio Freezing Medium TYB	38
Figura 12. Comparación múltiple de la motilidad progresiva recuperada de los 3 métodos de congelación utilizando el medio Sperm Freezing Medium.....	39
Figura 13. Vitalidad de los espermatozoides recuperados utilizando los 2 medios de congelación comerciales.....	40

Figura 14. Comparación múltiple de la vitalidad recuperada de los 3 métodos de congelación utilizando el medio Freezing Medium TYB41

Figura 15. Comparación múltiple de la vitalidad recuperada de los 3 métodos de congelación utilizando el medio Sperm Freezing Medium42

LISTA DE ABREVIATURAS

C: Concentración.

CEUMER: Centro Universitario de Medicina Reproductiva.

CI: Congelación inicial.

CL: Congelación lenta.

CPD: Concentración posterior a la descongelación.

ER: Eficacia de recuperación.

FIV: Fertilización in vitro.

FM-TYB: Freezing Medium TYB.

HSA: Albúmina sérica humana.

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoide.

IU: Inseminación intrauterina.

IMC: Índice de masa corporal.

MT: Motilidad total.

MTI: Motilidad total inicial.

MP: Motilidad progresiva.

MPI: Motilidad progresiva inicial.

SFM: Sperm Freezing Medium.

TRA: Terapia de reproducción asistida.

V: Vitalidad.

VM: Vitricación en microgotas.

VPD: Vitalidad posterior a la descongelación.

CAPITULO I

1. RESUMEN

La criopreservación del semen suele realizarse para preservar los espermatozoides de los pacientes que se someten a técnicas de reproducción asistida, como la inseminación con donantes, en quienes quieren y necesitan preservar sus espermatozoides antes de someterse a un tratamiento gonadotóxico, incluyendo quimioterapia y radioterapia. Por lo anterior, existen diversas técnicas para la criopreservación de semen. Sin embargo, los procedimientos de criopreservación disminuyen la vitalidad y la motilidad de los espermatozoides.

Objetivo: Comparar la eficacia de recuperación de espermatozoides criopreservados mediante vitrificación con microgotas y con la congelación lenta con dos medios de congelación comerciales.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio prospectivo, comparativo, y observacional, que incluyó pacientes varones entre 20 y 50 años que acudieron al Centro Universitario de Medicina Reproductiva del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, UANL durante el periodo de julio del 2021 a octubre 2021. La evaluación del semen inicial y post congelación se realizó siguiendo la guía de la Organización Mundial de la Salud (OMS - 7ma edición), a partir de las cuales se calculó la eficacia de recuperación. En este estudio se compararon dos métodos de congelación: congelación

lenta y vitrificación en microgotas, así como dos medios de congelación comerciales: Sperm Freezing medium y Freezing medium TYB.

Resultados: La eficacia de la recuperación de espermatozoides mediante congelación lenta fue mayor utilizando el medio de congelación Freezing Medium TYB en comparación con cualquiera de los otros métodos de congelación, así como también con el medio Sperm Freezing. Por otro lado, no se observó diferencia estadística entre la vitrificación en microgotas y la vitrificación convencional.

Conclusiones: La congelación lenta se asoció con mejor recuperación de espermatozoides vs la vitrificación en microgotas y convencional, con la utilización del medio de congelación Freezing Medium TYB. Se observó el mismo patrón a favor de la congelación lenta al evaluar cada uno de los parámetros del espermograma vitalidad, motilidad total y progresiva con excepción de concentración total de espermatozoides, documentando una diferencia según el medio de congelación utilizado. Esto sugiere que la congelación lenta es una buena opción en pacientes que se someterán a tratamientos o padecen alguna enfermedad que pone en riesgo su potencial reproductivo.

Palabras claves: Recuperación espermática, criopreservación, congelación lenta, vitrificación en microgotas

CAPITULO II

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Infertilidad

La infertilidad se define como la incapacidad de las parejas de concebir un bebe después de un año de relaciones sexuales sin protección, la cual afecta del 10-15% de las parejas¹. A nivel mundial, se estima que 48 millones de parejas y 186 millones de individuos sufren de infertilidad ¹.

Meta-análisis recientes reportaron que los factores masculinos son la causa del 20-70% de los casos de infertilidad. Por lo que dada la contribución del factor masculino en la infertilidad, la comprensión de los mecanismos subyacentes parece ser uno de los desafíos para enfrentar este problema ².

La criopreservación de espermatozoides humanos ha jugado un papel importante en la medicina reproductiva porque permite mantener su capacidad fertilizante por tiempo indefinido ³.

Sin embargo, durante la criopreservación convencional, el semen es sometido a un proceso en el que aproximadamente la mitad de los espermatozoides se pierde por lisis celular debido a la formación de cristales de hielo durante la congelación y por lo tanto afecta

negativamente a la calidad de la muestra después de la descongelación⁴.

Entre los factores que influyen en la recuperación de espermatozoides se encuentran la velocidad de congelación y descongelación, así como la elección y la concentración de crioprotectores⁵.

2.2 Criopreservación

La criopreservación es un proceso físico que implica el uso de bajas temperaturas para preservar la estructura y función celular, reduciendo la actividad metabólica a través del bloqueo total y homogéneo de los sistemas enzimáticos³.

La historia de la criobiología del esperma humano se remonta a finales de la década de 1940⁶. Esta técnica suele realizarse para preservar los espermatozoides de los pacientes que se someten a técnicas de reproducción asistida, en programas de inseminación de donantes, en pacientes que quieren y necesitan preservar sus espermatozoides, antes de someterse a un tratamiento que pueda causar problemas de infertilidad como quimioterapia, radioterapia, orquiectomía o vasectomía⁴. Así mismo, en pacientes que presentan alteraciones de los parámetros seminales, está indicada la criopreservación de espermatozoides para prevenir el riesgo de azoospermia⁷.

El principal desafío en la práctica clínica es garantizar que el paciente recupere su buena salud después de recibir los tratamientos pertinentes, ya que estos producen efectos secundarios adversos como alteración en la espermatogénesis, deficiencia de la testosterona o disfunción sexual, lo que afecta el bienestar reproductivo y psicológico del paciente ⁸.

En el caso de los pacientes con oligozoospermia severa, el tener concentrados con espermatozoides móviles en muestras descongeladas sería de suma importancia para su uso durante la realización de un ICSI, ya que solo requiere un espermatozoide por ovocito recuperado, brindándoles la oportunidad de llegar a reproducirse ⁵. Por lo tanto, la criopreservación de su esperma se realiza para evitar la recuperación repetida, así como también para preservar su esperma de cualquier efecto secundario de los diversos regímenes de tratamiento ⁸.

A temperaturas fisiológicas, las membranas espermáticas coexisten en dos fases, líquido y gel, pero como cuando la temperatura es muy baja, la fase de transición ocurre a favor de la formación de gel. Cuando la criopreservación se realiza, la fase de transición lleva a la reducción en la fluidez de la membrana, la cual está asociada con una motilidad y supervivencia espermática más baja ⁹.

A pesar de que los espermatozoides toleran una variedad de velocidades de enfriamiento y calentamiento, no son muy sensibles al daño causado por un enfriamiento inicial rápido, posiblemente debido a

la alta fluidez de la membrana de ácidos grasos insaturados en la bicapa lipídica, así como también debido a su bajo contenido de agua ⁶.

Existen diferentes métodos de criopreservación, que dependen de la velocidad de congelación, concentración de crioprotector y reducción de temperatura, que incluye congelación lenta (0.5-0° C/minuto), congelación rápida (50-400°C / minuto), congelación ultrarrápida (aproximadamente 2500°C/minuto) y vitrificación (aproximadamente 20 000 °C/minuto) ³.

La congelación y la descongelación del semen humano implica cierta pérdida de la motilidad y la capacidad fertilizante de los espermatozoides ¹⁰.

Independientemente de la técnica utilizada, el mayor desafío al que se enfrentan las células durante los procesos de congelación y descongelación es la letalidad en un rango de temperatura media entre -15 y -60°C ³.

El descubrimiento de que el glicerol protegía a los espermatozoides del daño por congelación llevó al uso de hielo seco para almacenar los espermatozoides humanos a -79 °C, posteriormente se utilizó nitrógeno líquido, lo que llevó a su empleo en varios países ⁶.

Las temperaturas por debajo de cero centígrados junto con los agentes crioprotectores (CPA) apropiados preservan las funciones fisiológicas y reproductivas de las células, haciendo posible el almacenamiento a largo plazo sin la pérdida de viabilidad asociada ¹¹.

Sin embargo, los espermatozoides tienen bajo nivel de tolerancia a altas concentraciones de crioprotectores, pudiendo causar efectos osmóticos letales y alteraciones químicas en los espermatozoides ¹².

Estudios previos han demostrado una interacción entre las tasas de enfriamiento y recalentamiento, por lo que las muestras enfriadas lentamente sobreviven mejor cuando se calientan lentamente y las muestras congeladas rápidamente han mejorado la supervivencia con una descongelación rápida ⁵.

Si los espermatozoides pasan periodos prolongados de tiempo por encima de -130°C , particularmente durante el proceso de descongelación, puede ocurrir recristalización, con la formación de cristales de hielo intracelulares ⁶.

El éxito de la criopreservación se mide en términos de motilidad posterior a la descongelación. Hasta ahora, la criopreservación no ha proporcionado una protección completa, ya que la motilidad de los espermatozoides conservados disminuye aproximadamente el 50% de su valor previo a la congelación. Se observa una disminución aún mayor en los espermatozoides de pacientes infértiles en comparación con los pacientes fértiles ¹².

El daño inducido por el proceso de congelación es causado por el estrés osmótico y mecánico durante la disminución de la temperatura, aunque una vez que los espermatozoides se congelan en nitrógeno líquido, el periodo de tiempo no aumenta la extensión del daño espermático ⁷. También se ha demostrado que el semen de pacientes

con oligozoospermia y/o astenozoospermia tiene una tendencia a reducir la criosupervivencia utilizando técnicas de congelación estándar en comparación con los controles normales ¹¹.

La criopreservación de espermatozoides ha evolucionado como una estrategia importante para la preservación de la fertilidad y la reproducción asistida en humanos. Los métodos de criopreservación de espermatozoides incluyen congelación lenta, congelación rápida (enfriamiento con vapor de nitrógeno líquido seguido de la inmersión directa en nitrógeno líquido) y vitrificación (inmersión directa en nitrógeno líquido) ¹³.

Hay dos categorías de citoprotectores: permeables como el dimetilsulfóxido (DMSO) y el glicerol, e impermeables como albúminas, dextranos y citrato de yema de huevo ⁶.

En cuanto a la criopreservación de semen crudo sin lavar, se informó que la presencia de plasma seminal durante el proceso de congelación proporciona mejores resultados después de la descongelación, a pesar de eso el líquido seminal no proporciona una protección completa de la criolesión de los espermatozoides, ya que aún puede verse una buena o mala calidad del semen ¹⁴.

Por lo tanto, preservar la fertilidad antes de los tratamientos que puedan llegar a afectarla es fundamental para garantizar una mejor calidad de vida ⁸. A pesar de todas las mejoras que se han realizado a lo largo de los años en base a los aspectos técnicos de la congelación y la

descongelación no existe un estándar de método establecido firmemente

15 .

2.3 Método convencional de criopreservación

La congelación lenta es un método en el que los espermatozoides se enfrían progresivamente durante un periodo de 2 a 4 horas en dos o tres pasos, ya sean en forma manual o automática¹¹. Es en la actualidad la técnica más utilizada en los laboratorios de andrología para la criopreservación de espermatozoides humanos ¹⁶.

Esta técnica permite el almacenamiento de grandes volúmenes de muestra con resultados aceptables para la vitalidad y la motilidad de los espermatozoides después de la descongelación ¹⁶. Se usa comúnmente para criopreservar espermatozoides tanto eyaculados como extraídos quirúrgicamente para preservar la fertilidad antes de tratamientos de cáncer, en casos de infertilidad severa por factor masculino y para el establecimiento de bancos de donantes ⁷.

Este presenta algunos inconvenientes: toxicidad de los crioprotectores y los posibles daños a la membrana plasmática del esperma provocados por la cristalización del hielo durante el proceso de enfriamiento. Además, es un procedimiento tedioso que requiere mucho tiempo ¹⁶. Los agentes crioprotectores permeables, como el glicerol,

producen efectos osmóticos y citotóxicos letales en los espermatozoides durante su proceso¹³.

En la técnica de congelación rápida, los espermatozoides se mezclan con el crioprotector y la suspensión se carga en la criopajilla o criovial, posteriormente se expone a una fase de vapor con nitrógeno líquido durante al menos 10 minutos antes de sumergirse en nitrógeno líquido¹¹.

En los últimos años, los investigadores han explorado otras técnicas más simples que requieren tecnología menos costosa, como la congelación ultrarrápida y la vitrificación¹⁷.

Varios estudios han comparado la congelación rápida con los protocolos de congelación más lentos, encontrando resultados contradictorios, mientras otros han informado que las técnicas son comparables⁵.

2.4 Vitrificación

La vitrificación es un método alternativo utilizado para el almacenamiento de espermatozoides humanos sin el uso de crioprotectores permeables. Con este método, la suspensión de esperma se sumerge directamente en nitrógeno líquido y los espermatozoides se enfrían de una manera ultrarrápida¹¹.

La vitrificación solidifica la muestra en un estado similar al del vidrio, evitando así la formación de cristales de hielo intra como extracelular. Esto se logra mediante el uso de concentraciones relativamente altas de agentes crioprotectores y/o velocidades de enfriamiento muy altas

(15,000-30,000°C/min) ¹⁷. Fue introducido por primera vez por el grupo de Isachenko⁴. Este método requiere reemplazar el crioprotector con una solución de proteínas (albumina de suero [HSA] al 1%) y carbohidratos (sacarosa 0.25M) ¹².

Es menos costosa, ya que no implica instrumentación adicional ¹⁷, por lo que representa una alternativa para los laboratorios con recursos limitados y con restricciones en el presupuesto ya que no se necesitan equipos de congelación especializados o adicionales ¹².

Esta técnica es mucho más eficiente en relación al tiempo, ya que requiere solo algunos minutos en comparación a la congelación lenta que requiere 1-2 horas a una velocidad controlada ¹⁷ y ha demostrado su eficacia en ovocitos y embriones. Esto ha sido posible gracias a una aceleración del proceso de criopreservación al minimizar los volúmenes de la solución con el desarrollo de diferentes dispositivos de vitrificación y la optimización de la combinación de crioprotectores ¹⁶. La vitrificación de los espermatozoides es diferente de la vitrificación celular convencional debido a la alta permeabilidad del crioprotector y la alta velocidad congelación necesaria para la vitrificación convencional la cual es letal para los espermatozoides ¹⁸.

2.5 Medios de congelación

Para mejorar los resultados de la congelación de espermatozoides, se han desarrollado muchos medios de criopreservación estandarizados diferentes ¹⁴.

Cada medio de congelación está compuesto por una combinación de osmolitos permeables y osmolitos no permeables. Los permeables estabilizan las proteínas intracelulares, reduciendo la temperatura a la cual se forman cristales de hielo intracelular, disminuyendo el impacto de los electrolitos intra y extracelulares dentro de la célula. Mientras que los osmolitos no permeables actúan como amortiguadores osmóticos para protegerse de la inflamación celular durante la adición/remoción de crioprotectores ⁹.

Se ha demostrado que la osmolaridad del medio de congelación juega un papel importante en la regulación del volumen de los espermatozoides, para evitarlo estos cuentan con mecanismos especializados, pero cuando estos fallan, los espermatozoides pueden aumentar de tamaño y la cola puede enroscarse afectando así su motilidad ¹⁴.

Los crioprotectores funcionan reduciendo la concentración de electrolitos durante la congelación, lo que lleva a la disminución de grado de contracción osmótica, por lo que el grado de protección depende principalmente de la relación molar del agente crioprotector con los solutos endógenos dentro y fuera de las células ¹⁵.

El Freezing Medium TYB es un medio de congelación comercial (IrvineScientific, Santa Ana, CA, USA) que contiene un amortiguador de yema de huevo, el cual funciona como extensor del semen y como amortiguador, que al combinarse con glicerol logra una mayor movilidad y viabilidad de los espermatozoides ¹⁹. Sperm Freezing Medium es un

medio de congelación (InVitroCare Inc., Frederick, MD, USA), el cual contiene glicina y sacarosa como agentes crioprotectores para mejorar la motilidad de los espermatozoides posterior a la descongelación, así como la integridad de la membrana y el acrosoma²⁰.

Varios estudios han analizado los efectos de diferentes medios comerciales para la criopreservación de esperma en la protección de los espermatozoides durante la congelación. Sin embargo, a la fecha los resultados son controvertidos¹⁴.

El uso de agentes crioprotectores es indispensable para la prevención de lesiones espermáticas durante el proceso de criopreservación¹⁵. A pesar de esto, se ha documentado que en gran parte la reducción de la motilidad observada durante la congelación y la descongelación de los espermatozoides se debe a la exposición a crioprotectores¹⁰. Debido a esto los estudios recomiendan que durante su proceso, los agentes crioprotectores deben equilibrarse para minimizar el daño mecánico y osmótico⁷

CAPITULO III

3. Justificación

Los procedimientos de criopreservación disminuyen la vitalidad y la motilidad de los espermatozoides, al producir lisis celular secundaria a la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación, afectando negativamente la calidad de la muestra después de la descongelación, impactando especialmente a pacientes que se someten a técnicas de reproducción asistida, ya sea en programas de inseminación con semen heterólogo o en pacientes que por otros motivos requieren preservar la muestra previamente al procedimiento, así como en pacientes que requieren preservar espermatozoides antes de someterse a un tratamiento que pueda afectar la fertilidad, como quimioterapia, radioterapia, orquiectomía o vasectomía.

Por tanto, es necesaria la evaluación de diferentes métodos de congelación como la vitrificación en microgotas, la cual no se ha empleado en el CEUMER y que potencialmente podría reducir el daño celular producido durante el proceso de congelación- descongelación de los espermatozoides.

CAPITULO IV

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál método de congelación de espermatozoides (vitrificación en microgotas o congelación lenta) y cuál medio de cultivo (Sperm Freezing Medium o Freezing Medium TYB) ofrece la mayor eficacia de recuperación de espermatozoides posterior a la descongelación?

CAPITULO V

5. HIPÓTESIS

5.1 Hipótesis nula

La eficacia de la recuperación de espermatozoides en la vitrificación en microgotas es igual a la obtenida en la congelación lenta, usando cualquiera de los dos medios de congelación comerciales.

5.2 Hipótesis alterna

La eficacia de la recuperación de espermatozoides en la vitrificación en microgotas es diferente a la obtenida en la congelación lenta, usando uno de los dos medios de congelación comerciales.

CAPITULO VI

6. OBJETIVOS

a) **Objetivo general**

Comparar la eficacia de recuperación de espermatozoides criopreservados mediante vitrificación en microgotas y por congelación lenta usando dos medios de congelación comerciales.

b) **Objetivos secundarios**

Evaluar la vitalidad, movilidad (total y progresiva) y concentración de espermatozoides recuperados de muestras criopreservadas por vitrificación en microgotas y por congelación lenta usando el medio de congelación Sperm Freezing Medium y el Freezing Medium TYB.

CAPITULO VII

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, comparativo, y observacional en el Centro Universitario de Medicina Reproductiva (CEUMER) del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León durante el periodo de julio del 2021 a octubre del 2021.

El estudio incluyó pacientes varones entre 20 y 50 años que acudieron al CEUMER, con abstinencia de 2-7 días al momento de la recolección de la muestra y que proporcionaron su consentimiento informado en forma verbal. Se excluyeron muestras que no presentaron espermatozoides (azoospermia), con motilidad total < 30% y/o volumen < 0.8 ml.

7.1 Procedimiento

Durante la primera cita previa al procedimiento de reproducción asistida y/o realización del espermograma, se le explicó al paciente en qué consistía el estudio de investigación y se le invitó a participar, se obtuvo el consentimiento informado en forma verbal y se incluyeron aquellos pacientes que aceptaron participar en el estudio. Además, se realizó un cuestionario de factores de riesgo para infertilidad masculina, el cual fue interrogado por el médico y contestado por el paciente.

Posteriormente, se le proporcionó al paciente un recipiente de plástico estéril, el cual fue etiquetado con su nombre, edad, hora de recolección y días de abstinencia. El paciente recolectó una muestra de semen por medio de masturbación, según las características previamente mencionadas.

Una vez obtenida la muestra de semen, se colocó en una incubadora a una temperatura de 37°C por un periodo de 30 minutos para permitir su licuefacción. La muestra inicial de semen fue evaluada de acuerdo con los parámetros de las guías de la Organización Mundial de la Salud (7ma edición), registrando los parámetros espermáticos de concentración, movilidad (total y progresiva) y vitalidad. Posteriormente, se dividió la muestra de semen en 2 alícuotas de 0.5 ml. Una alícuota fue procesada con el medio de congelación Sperm Freezing Medium (InVitroCare Inc, Frederick, MD, USA) y la otra con Freezing Medium TYB (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, a los 0.5 ml de semen licuado se le agregaron 0.5 ml del medio de congelación en una proporción de 1:1 vol.-vol. mediante goteo, mezclando por agitación suave después de cada gota añadida, la suspensión obtenida se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos para permitir el equilibrio de la suspensión. Pasados los 10 minutos de incubación a temperatura ambiente la muestra se dividió en 3 alícuotas de 0.3 ml cada una, de las cuales una fue sometida a congelación lenta, otra a vitrificación en microgotas y otra a vitrificación convencional.

Para la vitrificación en microgotas, se utilizó una pipeta Pasteur para la liberación gota a gota de 0.3 ml de la suspensión de espermatozoides-medio de congelación hacia el nitrógeno líquido, al momento de caer en el nitrógeno líquido las microgotas se vitrificaron. Las perlas obtenidas se transfirieron a un criovial de 1 mL y se colocaron directamente en el nitrógeno líquido. Mientras que para las muestras con congelación lenta 0.3 ml de la suspensión de espermatozoides-medio de congelación se colocaron en un criovial de 1mL, el cual se mantuvo a una temperatura de 4°C durante 90 minutos. Posteriormente, el criovial se puso en contacto con el vapor de nitrógeno líquido durante 30 minutos y posteriormente se sumergió en nitrógeno líquido.

La vitrificación consistió en colocar 0.3 ml de la suspensión en un criovial, el cual fue sumergido directamente en el nitrógeno líquido.

En todos los casos, la descongelación se realizó mediante la exposición a temperatura ambiente durante 5 minutos, posteriormente se mantuvo en la incubadora a una temperatura de 37°C durante 10 minutos.

Finalmente se evaluó la muestra descongelada de semen de acuerdo con los parámetros de las guías de la Organización Mundial de la Salud (7ma edición) ⁶, registrando los parámetros espermáticos de concentración, movilidad (total y progresiva) y vitalidad post descongelación. Posteriormente se calculó la eficacia de la recuperación de espermatozoides con la siguiente fórmula:

$$ER (\%) = \frac{MP_f}{MP_i} \times 100$$

Donde ER es la eficacia de la recuperación de espermatozoides en porcentaje, MP_f es la motilidad progresiva posterior a la descongelación y MP_i es la motilidad progresiva inicial de la muestra.

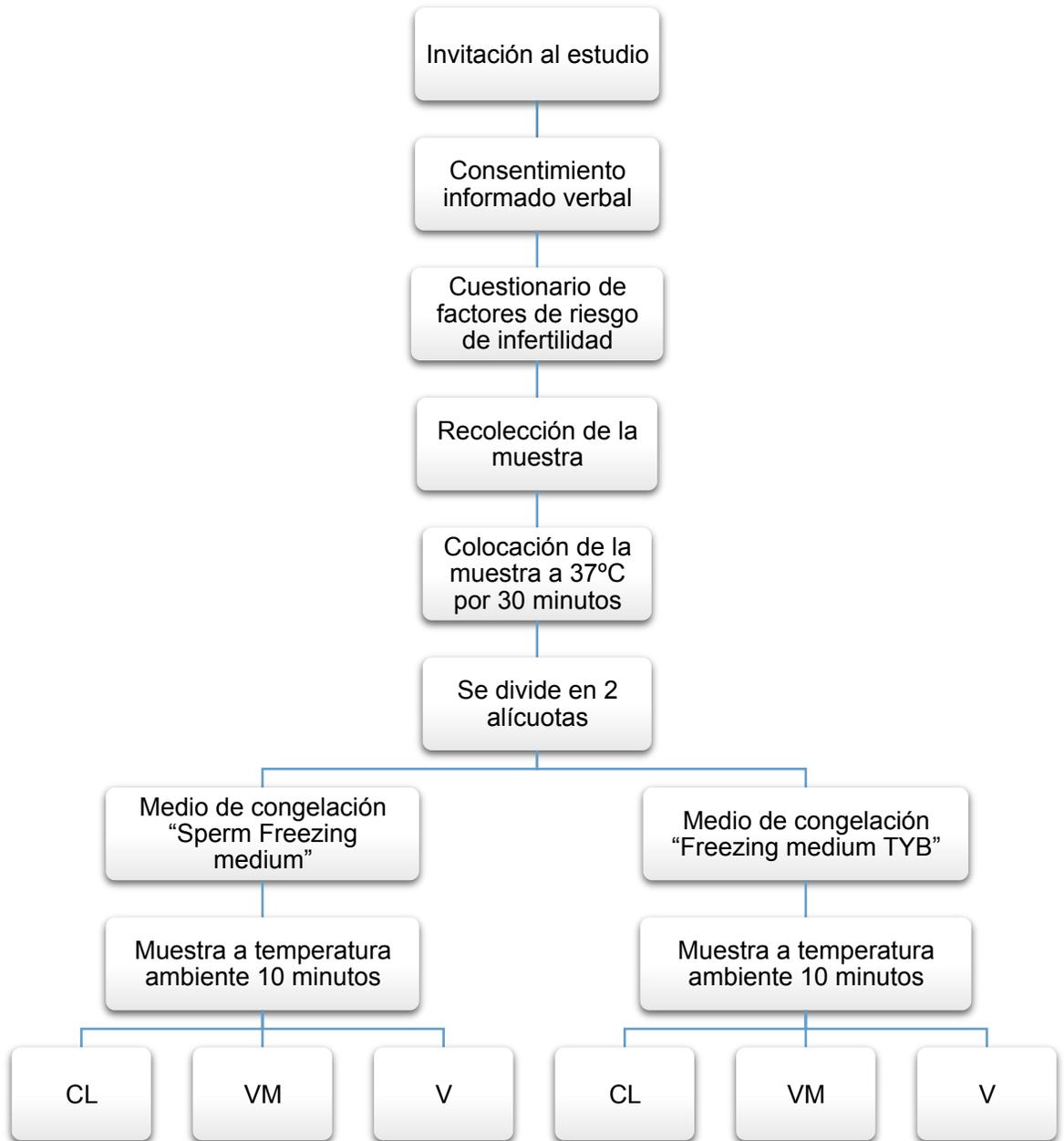


Figura 1. Estrategia general de estudio

7.2 Cálculo muestral

El cálculo del tamaño muestral $\hat{p}_1 - \hat{p}_2 = b-c/ n$ pares se realizó con el programa Epidat 4.2. Para el contraste de hipótesis de comparación de proporciones emparejadas para la población 1, 16.6% ¹⁶ (media de móviles progresivos, congelación lenta) y para la población 2, 42.3% ⁴ (media de móviles progresivos, vitrificación) con un nivel de confianza 95% ($Z_{1-\alpha/2} = 1.960$), para un poder estadístico del 80% ($Z_{1-\beta} = -0.842$), resultando 51 pares.

7.3 Análisis estadístico

Se realizó una base de datos electrónica utilizando el programa Microsoft Excel V16.5, en la que se registraron los parámetros espermáticos iniciales, así como los valores posteriores a la descongelación espermática. Para el análisis descriptivo; las variables categóricas se estimaron en frecuencias y proporciones y las variables continuas con medidas de tendencia central (media, mediana) y de dispersión (desviación estándar, cuartiles).

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Prisma 8 para Windows. Se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente, las comparaciones se realizaron mediante la prueba de Friedman y la comparación múltiple se realizó post hoc con la prueba de Dunn. Para comparar las medias de dos grupos se empleó la prueba de T para muestras con distribución normal y la prueba de rangos

con signo de Wilcoxon cuando los datos no tuvieron una distribución normal.
Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

7.4 Comité de ética

El presente proyecto fue aprobado por el comité de ética de esta institución, con clave de registro GI21-00013.

CAPITULO VIII

8. RESULTADOS

El estudio incluyó 51 pacientes que acudieron al Centro Universitario de Medicina Reproductiva (CEUMER) del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” durante el año 2021 para un procedimiento de reproducción asistida y/o realizarse un espermograma para conocer su estado de fertilidad.

Las características demográficas de los pacientes incluidos en este estudio (n = 51) se describen en la tabla 1, en la que destaca que los pacientes tuvieron una edad promedio de 34 ± 7.06 años, así como también de acuerdo con el IMC, la media se encontró con sobrepeso con un IMC 28.3 ± 5.04 kg/m², a espesas de una media promedio de peso de 86.9 ± 19.3 kg y una media de talla de $1.74 \pm .07$ m.

Tabla 1.- Características descriptivas de los 51 pacientes incluidos que se realizaron un espermograma para un procedimiento de reproducción asistida y/o conocer su estado de fertilidad

	Media \pm DE
Edad	34.5 ± 7.06
Peso (kg)	86.9 ± 19.3
Talla (m)	$1.74 \pm .07$
IMC (kg/m²)	28.3 ± 5.04

El tiempo promedio de abstinencia sexual el día de la recolección de muestra fue de 4 días.

En cuanto a los antecedentes y factores de riesgo de los pacientes incluidos, 30% (n=15) tenían fertilidad comprobada y el 70% (n=36) no tenían hijos al momento del estudio. 10% (n=5) de los pacientes presentaban antecedentes familiares de problemas de fertilidad, sin embargo, ninguno especificó el tipo de problema de fertilidad. Además, 10% (n=5) de ellos tenían diagnóstico previo de problemas de fertilidad, de los cuales 4% (n=2) de los participantes tenían astenozoospermia o motilidad disminuida de los espermatozoides, 2% (n=1) oligozoospermia o baja concentración de los espermatozoides, 2% (n=1) teratozoospermia o con alteraciones en la morfología y 2% (n=1) desconocían el problema que presentaba. 18% (n=9) de los participantes presentaban antecedentes quirúrgicos, sin embargo, solo 2% (n=1) (varicocele) tenía relevancia en relación con la fertilidad.

Solo el 2% (n=1) de los participantes reportó problemas para eyacular y mantener la erección, 4% (n=2) de los pacientes refirieron un trauma genital, de los cuales el 2% (n=1) refirió trauma testicular y otro 2% (n=1), torsión testicular. En cuanto a las enfermedades previas, 21% (n=11) de los participantes reportaron una enfermedad de base previa. Algunos pacientes reportaron una enfermedad de base previa de los cuales: 2% (n=1) era diabético, 2% (n=1) era hipertenso, 4% (n=2) presentaban crisis de ansiedad, 2% (n=1) extrasístoles ventriculares, 2% (n=1) dislipidemia mixta, 2% (n=1) hernia inguinal no tratada, 2% (n=1) epilepsia, 2% (n=1) leucemia mieloide crónica y 2% (n=1) hemorroides.

En cuanto a los factores de riesgo modificables, la actividad laboral que realizaban el 13.7% (n=7) refirió ser empleado, 11.8% (n=6) comerciante, 15.7% (n=8) ingeniero, 21.6% (n=11) médico, el 7.8% (n=4) chofer, 2% (n=1) electricista, 3.9% (n=2) supervisor, 2% (n=1) de mantenimiento, 3.9% (n= 2) abogado, 3.9% (n=2) maestro, 5.9% (n=3) empresario, 2% (n=1) estudiante y 2% (n=1) licenciado.

El 49% (n=25) refirió pasar mucho tiempo sentado, sin embargo, fue muy variable el tiempo mencionado, con un rango de 3 a 12 horas. El 25.5% (n=13) refirió tabaquismo de los cuales el 7.8% (n=4) en forma social, 13.7% (n=7) < 5 cigarros al día, 3.9% (n=2) 6-15 cigarros al día, 74.5% (n=38) > 15 cigarros al día. El 80.4% (n=41) refirió consumo de alcohol, de los cuales 62.7% (n=32) lo consumían en forma social, 2% (n=1) diario, 5.9% (n=3) 1 vez a la semana, 3.9% (n=2) los fines de semana, 5.9% (n=3) 1 vez al mes. Solo el 2% (n=1) refirió el uso de marihuana.

En la figura 2 se muestran los parámetros espermáticos iniciales individuales, con una línea se identifican la media y el rango de los valores observados. La concentración inicial promedio fue de 59.4 ± 53.13 millones/ml, el promedio de la movilidad total inicial fue de 48.07 ± 22.9 %, la movilidad progresiva inicial 41.9 ± 23.15 %, con una vitalidad inicial 64.7 ± 21.24 %.

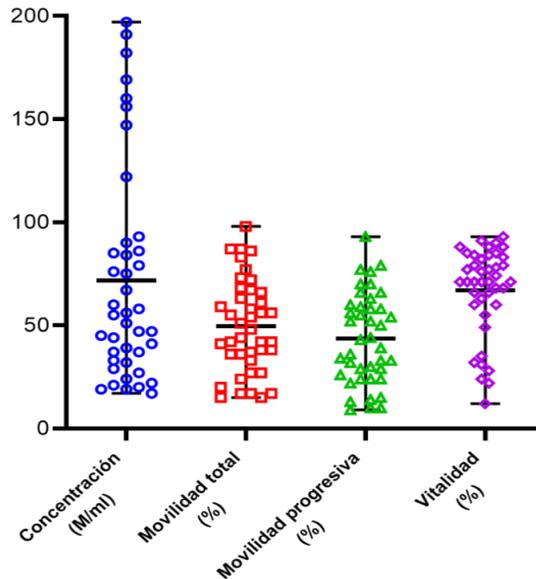


Figura 2. Parámetros espermáticos iniciales

Este estudio se enfocó en la comparación de medios de congelación disponibles comercialmente (Sperm Freezing Medium y Freezing Medium TYB), así como en 3 técnicas de congelación de espermatozoides (congelación lenta, vitrificación en microgotas y convencional).

Primeramente, fueron comparados los medios de congelación utilizando la prueba de Wilcoxon encontrando una diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre ellos, mostrando una mayor eficacia en la recuperación al emplear el medio Freezing Medium TYB. Posteriormente se compararon las técnicas de congelación con el medio Freezing Medium TYB por medio de la prueba de Friedman, obteniendo una diferencia significativa entre las técnicas de congelación ($F = 28.98$, $p < 0.0001$).

Se realizó un análisis de comparación múltiple con la prueba de Dunn que evidenció que la congelación lenta ofrecía una mayor recuperación de espermatozoides con respecto a la vitrificación en microgotas ($p = 0.0004$) y con

respecto a la vitrificación convencional ($p < 0.0001$). No se encontraron diferencias entre vitrificación en microgotas y vitrificación convencional (Tabla 2).

Tabla 2.- Comparación múltiple de la recuperación de espermatozoides usando el Freezing Medium TYB.

<i>Comparación múltiple de Dunn</i>	<i>Diferencia de suma de rangos</i>	<i>P</i>
VM vs. CL	-38.50	0.0004 ***
VM vs. V	10.00	0.9663 ns
CL vs. V	48.50	<0.0001****

Al analizar las características espermáticas iniciales, se observa un rango amplio de concentraciones. Lo que nos llevó a cuestionar si nuestras observaciones se mantendrían al subdividir las muestras de acuerdo a su concentración. Por tanto, se dividieron las muestras en dos grupos, oligozoospermia (≤ 15 M/ml) ($n=10$) y normozoospermia (>15 M/ml) ($n=41$) (Figura 3).

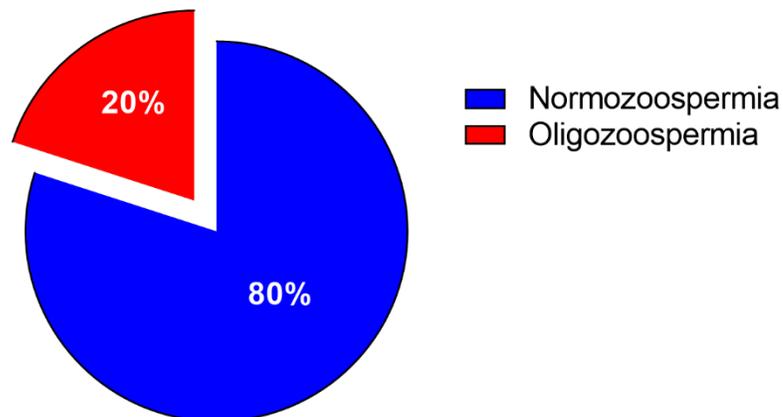


Figura 3. Clasificación de las muestras según su concentración.

En el grupo de oligozoospermia, se comparó la congelación lenta utilizando los 2 medios de congelación comerciales (Freezing Medium TYB y Sperm Freezing Medium) por medio de la prueba de T pareada mostrando que no hay diferencias significativas entre la congelación lenta al emplear cualquiera de los 2 medios de congelación ($p=0.6059$) (Tabla 3).

Tabla 3.- Comparación múltiple de la recuperación de espermatozoides usando Sperm Freezing Medium.

<i>Comparación múltiple de Dunn</i>	<i>Diferencia de suma de rangos</i>	<i>P</i>
VM vs. V	-2.000	>0.9999 ns
VM vs. CL	-8.500	0.1720 ns
V vs. CL	-6.500	0.4383 ns

Por otro lado, en el grupo de pacientes normozoospermicos, se comparó la congelación lenta utilizando los 2 medios de congelación comerciales por medio de la prueba de Wilcoxon para muestras no normales, mostrando una diferencia estadísticamente significativa con la realización de la congelación lenta utilizando el medio Freezing Medium TYB ($p < 0.0001$) (Tabla 4).

Tabla 4.- Comparación múltiple de la recuperación de espermatozoides usando Freezing Medium TYB en muestras con normozoospermia.

<i>Comparación múltiple de Dunn</i>	<i>Diferencia de suma de rangos</i>	<i>P</i>
VM vs. V	3.500	>0.9999 ns
VM vs. CL	-30.50	0.0023 **
V vs. CL	-34.00	0.0005 ***

En cuanto a los objetivos secundarios primero se verificó la normalidad de la distribución de la concentración espermática recuperada utilizando los dos medios de congelación comerciales por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando una distribución no normal.

Se comparó la concentración de espermatozoides recuperados utilizando los dos medios de congelación comerciales por medio de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, la cual no mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.9979$) (Figura 4).

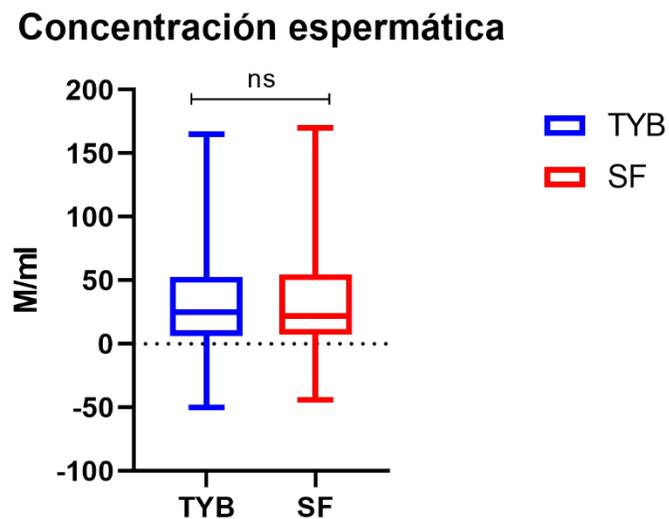


Figura 4. Diferencia en la concentración espermática recuperada utilizando los dos medios comerciales

Posteriormente se revisó la normalidad de la distribución de la concentración de espermatozoides recuperados utilizando el medio Freezing Medium TYB por medio de los tres métodos de congelación utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando una distribución no normal.

Se determinó si existía una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la concentración de espermatozoides inicial respecto a la concentración de espermatozoides recuperados según los tres métodos de congelación, utilizando el medio Freezing Medium TYB por medio de la prueba

de Friedman mostrando que no existe una diferencia estadísticamente significativa (Figura 5).

Concentración espermática TYB

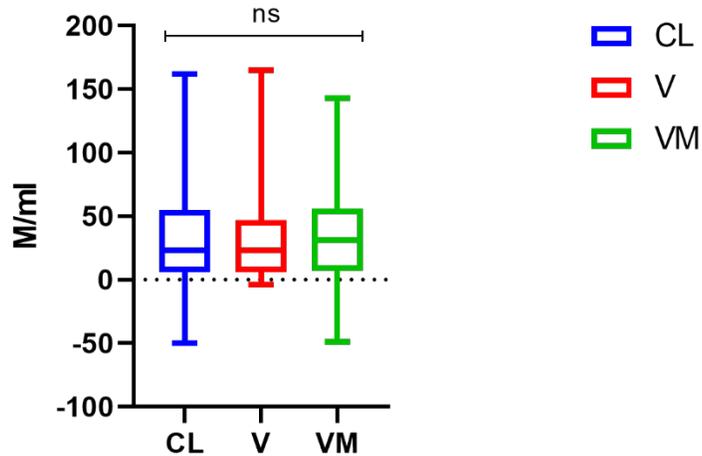


Figura 5. Diferencia entre las medias de la concentración de espermatozoides inicial respecto a la concentración de espermatozoides recuperados según los tres métodos de congelación utilizando el medio Freezing Medium TYB

Se analizó la normalidad de la distribución de la concentración de espermatozoides recuperados utilizando el medio Sperm Freezing Medium por medio de los tres métodos de congelación utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando una distribución no normal.

Se determinó si existía una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la concentración de espermatozoides inicial respecto a la concentración de espermatozoides recuperados según los tres métodos de congelación, utilizando el medio Sperm Freezing Medium por medio de la

prueba de Friedman, mostrando que no existe una diferencia estadísticamente significativa (Figura 6).

Concentración espermática SF

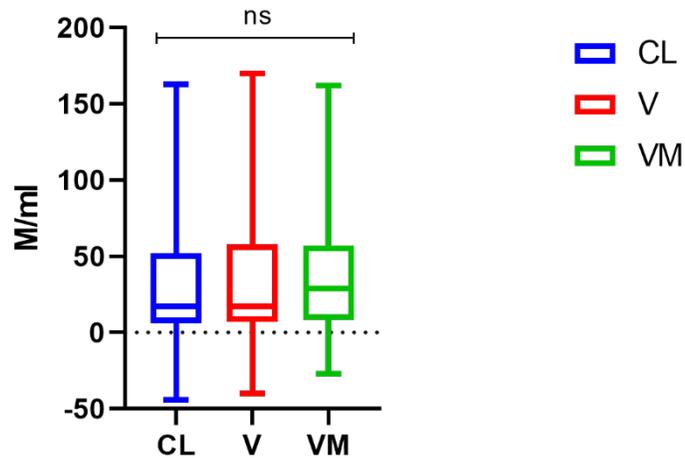


Figura 6. Diferencia entre las medias de la concentración de espermatozoides inicial respecto a la concentración de espermatozoides recuperados según los tres métodos de congelación utilizando el medio Sperm Freezing Medium

Se verificó la normalidad de la distribución de la motilidad total de espermatozoides recuperados utilizando los dos medios de congelación comerciales por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando una distribución normal.

Se comparó la motilidad total de los espermatozoides recuperados utilizando los dos medios de congelación comerciales por medio de la prueba de T emparejada, lo cual comprobó una diferencia estadísticamente significativa ($p =$

0.0009) a favor del medio Sperm Freezing Medium, el cual mostró una mayor pérdida en la motilidad total respecto a la basal (Figura 7.)

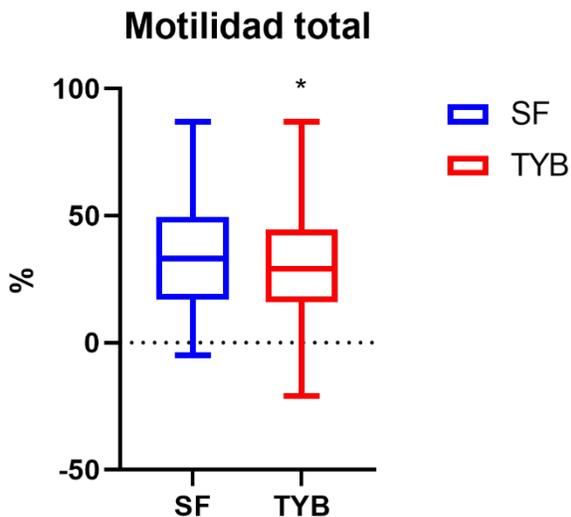


Figura 7. Motilidad total de espermatozoides recuperados utilizando los dos medios de congelación comerciales

Posteriormente se verificó la normalidad de la distribución de la motilidad total de espermatozoides recuperados utilizando el medio Freezing Medium TYB por medio de los tres métodos de congelación utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando una distribución normal.

Se determinó si existía una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la motilidad total inicial respecto a la motilidad total recuperada según los tres métodos de congelación, utilizando el medio Freezing Medium TYB por medio de la prueba de ANOVA de una vía mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$).

Se realizó un análisis de comparación múltiple con la prueba de Tukey, lo que evidenció que la congelación lenta con el medio Freezing Medium TYB ofrece una mayor recuperación espermática comparativamente con la vitrificación en microgotas y la vitrificación convencional ($p < 0.0001$). No se encontraron diferencias entre vitrificación en microgotas y vitrificación convencional (Figura 8).

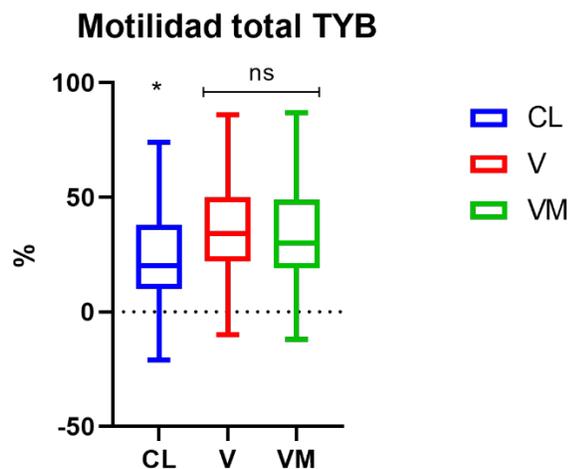


Figura 8. Comparación múltiple de la motilidad total recuperada con los tres métodos de congelación utilizando el medio Freezing Medium TYB

Se analizó la normalidad de la distribución de la motilidad total de espermatozoides recuperados con el medio Sperm Freezing Medium por medio de los tres métodos de congelación utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando una distribución normal.

Se determinó si existía una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la motilidad total inicial respecto a la motilidad total recuperada según los tres métodos de congelación, utilizando el medio Sperm Freezing Medium por medio de la prueba de ANOVA de una vía mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$).

Se realizó un análisis de comparación múltiple con la prueba de Tukey donde se evidenció que la congelación lenta con el medio Sperm Freezing Medium presentaba una menor disminución en la motilidad total de espermatozoides con respecto a la vitrificación en microgotas y vitrificación convencional ($p < 0.0001$). No se encontraron diferencias entre vitrificación en microgotas y vitrificación convencional (Figura 9).

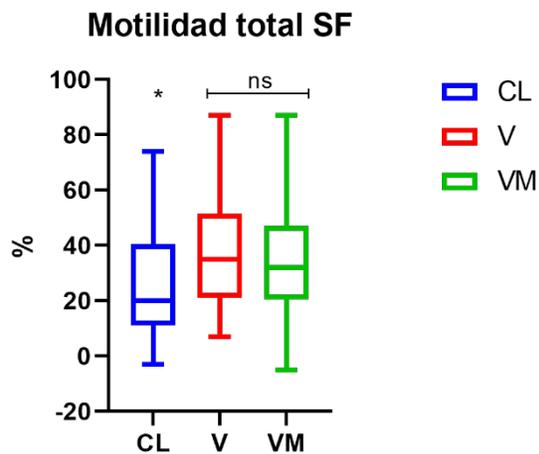


Figura 9. Comparación múltiple de la motilidad total recuperada en los tres métodos de congelación utilizando el medio Sperm Freezing Medium

Se verificó la normalidad de la distribución de la motilidad progresiva de espermatozoides recuperados utilizando los dos medios de congelación

comerciales por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando una distribución no normal.

Se comparó la motilidad progresiva de los espermatozoides recuperados utilizando los dos medios de congelación comerciales por medio de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, la cual mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) a favor del medio Sperm Freezing Medium, el cual mostró una mayor pérdida en la motilidad progresiva respecto a la basal (Figura 10.)

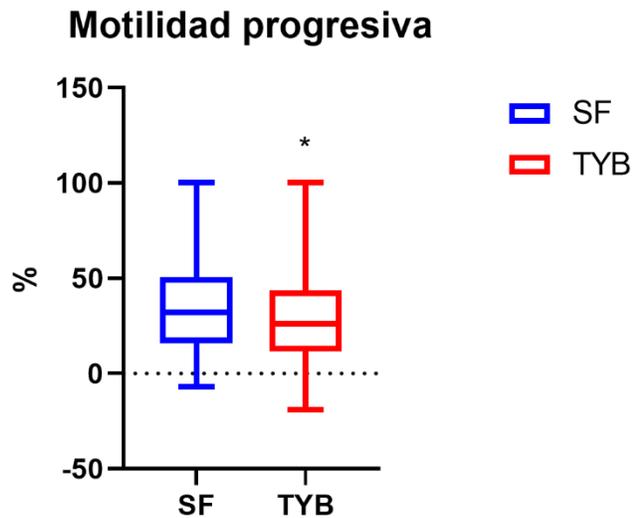


Figura 10. Motilidad progresiva de los espermatozoides recuperados utilizando los dos medios de congelación comerciales

Se verificó la normalidad de la distribución de la motilidad progresiva de espermatozoides recuperados utilizando el medio Freezing Medium TYB por

medio de los tres métodos de congelación utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando una distribución normal.

Se determinó si existía una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la motilidad progresiva inicial respecto a la motilidad progresiva recuperada según los tres métodos de congelación, utilizando el medio Freezing Medium TYB por medio de la prueba de ANOVA de una vía mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$).

Se realizó un análisis de comparación múltiple con la prueba de Tukey, donde se evidenció que la congelación lenta con el medio Freezing Medium TYB presentaba una menor disminución en la motilidad progresiva con respecto a la vitrificación en microgotas y vitrificación convencional ($p = 0.0002$). No se encontraron diferencias entre vitrificación en microgotas y vitrificación convencional (Figura 11).

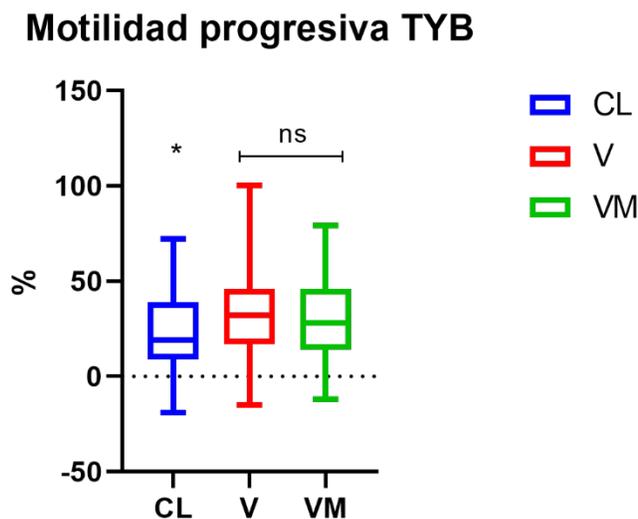


Figura 11. Comparación múltiple de la motilidad progresiva recuperada de los tres métodos de congelación utilizando el medio Freezing Medium TYB

Se verificó la normalidad de la distribución de la motilidad progresiva de espermatozoides recuperados utilizando el medio Sperm Freezing Medium por medio de los tres métodos de congelación utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando una distribución normal.

Se determinó si existía una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la motilidad progresiva inicial respecto a la motilidad progresiva recuperada según los tres métodos de congelación, utilizando el medio Sperm Freezing Medium por medio de la prueba de ANOVA de una vía mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$).

Se realizó un análisis de comparación múltiple con la prueba de Tukey, donde se probó que la congelación lenta con el medio Sperm Freezing Medium presentaba una menor disminución en la motilidad progresiva con respecto a la vitrificación en microgotas y vitrificación convencional ($p < 0.0001$). No se encontraron diferencias entre vitrificación en microgotas y vitrificación convencional (Figura 12).

Motilidad progresiva SF

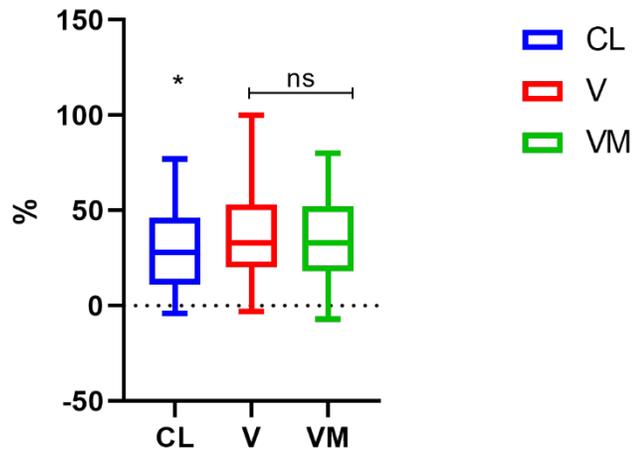


Figura 12. Comparación múltiple de la motilidad progresiva recuperada en los tres métodos de congelación utilizando el medio Sperm Freezing Medium

Se verificó la normalidad de la distribución de la vitalidad de espermatozoides recuperados utilizando los dos medios de congelación comerciales por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando una distribución no normal.

Se comparó la vitalidad de los espermatozoides recuperados utilizando los dos medios de congelación comerciales por medio de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, la cual mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) (Figura 13)

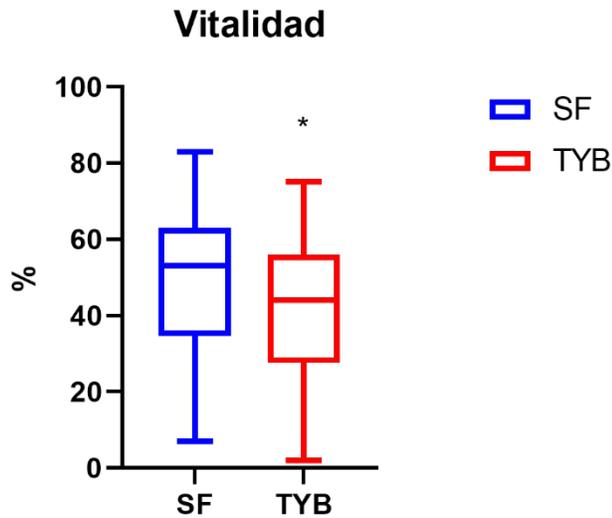


Figura 13. Vitalidad de los espermatozoides recuperados utilizando los dos medios de congelación

Se verificó la normalidad de la distribución de la vitalidad de espermatozoides recuperados utilizando el medio Freezing Medium TYB por medio de los tres métodos de congelación utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando una distribución no normal.

Se determinó si existía una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la vitalidad inicial respecto a la vitalidad recuperada según los tres métodos de congelación, utilizando el medio Freezing Medium TYB por medio de la prueba de Friedman mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$).

Se realizó un análisis de comparación múltiple con la prueba de Dunn, donde se comprobó que la congelación lenta con el medio Freezing Medium TYB presentaba una menor disminución en la vitalidad con respecto a la

vitrificación en microgotas y vitrificación convencional ($p < 0.0001$). No se encontraron diferencias entre vitrificación en microgotas y vitrificación convencional (Figura 14).

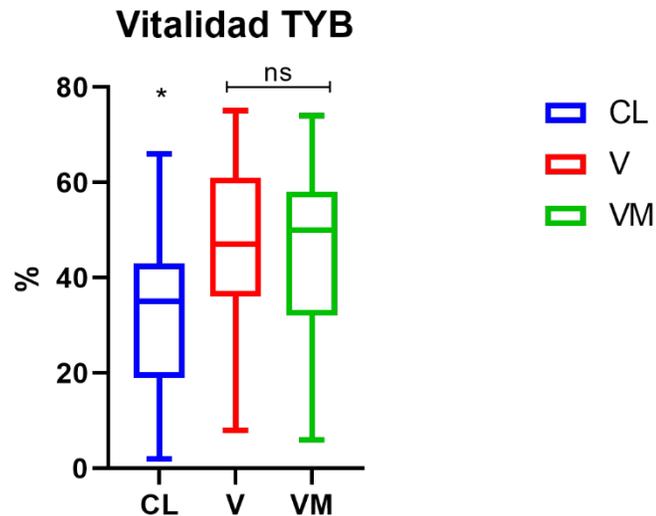


Figura 14. Comparación múltiple de la vitalidad recuperada de los tres métodos de congelación con el medio Freezing Medium TYB

Se verificó la normalidad de la distribución de la vitalidad de espermatozoides recuperados utilizando el medio Sperm Freezing Medium por medio de los tres métodos de congelación utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando una distribución no normal.

Se determinó si existía una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la vitalidad inicial respecto a la vitalidad recuperada según los tres métodos de congelación, utilizando el medio Sperm Freezing Medium por medio

de la prueba de Friedman mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$).

Se realizó un análisis de comparación múltiple con la prueba de Dunn, donde se comprobó que la congelación lenta con el medio Sperm Freezing Medium presentaba una menor disminución en la vitalidad con respecto a la vitrificación en microgotas y vitrificación convencional ($p < 0.0001$). No se encontraron diferencias entre vitrificación en microgotas y vitrificación convencional (Figura 15).

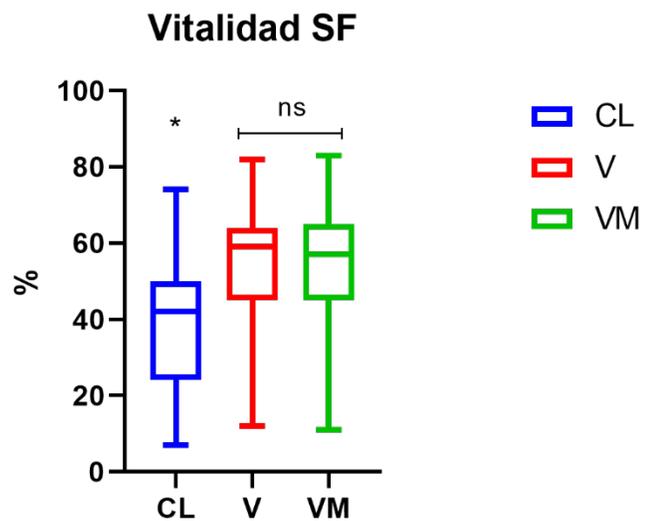


Figura 15. Comparación múltiple de la vitalidad recuperada de los tres métodos de congelación con el medio Sperm Freezing

9. DISCUSIÓN

Esta investigación estudió, evaluó y comparó la eficacia de la recuperación de espermatozoides utilizando tres diferentes métodos de congelación-descongelación, así como también dos diferentes medios de congelación comerciales en espermatozoides humanos.

El resultado principal sugiere que existe una mayor eficacia en la recuperación de espermatozoides mediante congelación lenta con la utilización del medio de congelación Freezing medium TYB comparativamente con cualquier otro de los métodos de congelación y con la utilización Sperm Freezing Medium, tanto en muestras con normozoospermia como con oligozoospermia. Así mismo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la vitrificación en microgotas y la vitrificación convencional. Esto difiere de lo reportado previamente por Aizpurua J et al (2017), quienes reportaron niveles significativamente más altos de motilidad progresiva de los espermatozoides después de la vitrificación en comparación con la congelación lenta ²¹.

La criopreservación de semen es un procedimiento de gran utilidad para preservar la fertilidad en el hombre, particularmente en pacientes oncológicos, con vasectomía u otras cirugías obstructivas, programas de donación de gametos para minimizar las enfermedades de transmisión sexual, o cuando la pareja masculina es incapaz de dar una muestra adecuada de semen el día de la recolección de los ovocitos ²².

Dado que la criopreservación del semen implica la manipulación de gametos humanos que probablemente se utilizarán en forma terapéutica para el desarrollo de embriones, los métodos implicados deben ser seguros, eficaces y reproducibles ²³.

La principal preocupación de estos pacientes son las dificultades técnicas al tratar un número tan pequeño de células, los efectos citotóxicos de los crioprotectores y el riesgo de contaminación cruzada cuando se utilizan sistemas de congelación abiertos ²². Por esto, es necesario establecer un medio de criopreservación más efectivo en la recuperación y supervivencia de los espermatozoides con un medio de congelación más estable a pesar de las características iniciales de la muestra.

Se han adoptado dos enfoques principales la congelación lenta y la vitrificación. La congelación lenta como técnica tradicional se ha empleado con éxito y se ha utilizado ampliamente en las clínicas de terapia de reproducción asistida, mientras que la vitrificación es un proceso para solidificar líquido en un estado amorfo o vítreo, el cual algunos artículos consideran una alternativa al ser una técnica de criopreservación de espermatozoides más rápida con un equipo más sencillo y aplicable en los centros de fertilidad ²⁴.

Publicaciones previas reportan un efecto deletéreo al emplear el método de congelación lenta, teniendo un efecto dañino más pronunciado en muestras con oligoastenoteratozoospermia severa o alteraciones en la cantidad, movilidad y morfología que en muestras normoespérmicas ²³. En nuestro estudio no se observó tal relación, ya que independientemente de la

concentración de espermatozoides, el método de congelación lenta mostró una mayor eficacia en la recuperación de espermatozoides que la vitrificación convencional y en microgotas, independientemente del medio de congelación utilizado. Esto implica que la congelación lenta al ser una técnica ampliamente conocida, utilizada y dominada por el personal de laboratorio, tiene una mejor implementación del método y primordialmente mayor eficacia en la recuperación de espermatozoides.

Un meta-análisis publicado en el 2019, reportó una motilidad total y progresiva post descongelación significativamente más alta con la vitrificación comparado con la congelación lenta ²⁵. Esta posible discrepancia puede deberse en parte a que los estudios evaluados utilizaron diferentes medios de congelación, así como diferentes protocolos de vitrificación, lo cual podría explicar la variabilidad relacionada con nuestros resultados.

Del mismo modo, Aizpurua J et al (2017) reportaron niveles significativamente más altos de motilidad progresiva de los espermatozoides después de la vitrificación en comparación con la congelación lenta²¹.

Esto difiere de los hallazgos reportados por un estudio publicado en el 2004, el cual reportó resultados similares a los nuestros, en muestras congeladas con Freezing Medium TYB, que mostraron tasas de motilidad total y criosupervivencia posterior a la descongelación significativamente más altas con su utilización ¹⁵.

Otras publicaciones han evaluado otros medios de congelación para prevenir o disminuir el daño producido posterior a la descongelación, los cuales han documentado que tanto los parámetros de motilidad total como progresiva son significativamente mayores post descongelación con la utilización de un medio de congelación con sacarosa 0.3 M con 20% de suplemento dextran ²².

Otros autores han reportado una disminución en la vitalidad de los espermatozoides tanto en la vitrificación como en congelación lenta, la cual posiblemente se debe a alteraciones en la membrana, provocadas por variaciones en la temperatura o roturas que producen daños subletales ²¹.

Según algunas publicaciones los procesos de congelación y descongelación parecen no tener efectos perceptibles sobre los espermatozoides morfológicamente normales ¹⁰.

La eficacia de la vitrificación se ve influenciada por el uso de diferentes protocolos de vitrificación y criopreservación de espermatozoides de diferente calidad ²⁵.

Una forma de abordar si la vitrificación o la congelación lenta es superior, es comparar directamente los dos métodos de congelación con la misma muestra de semen tal como se realizó en nuestro estudio. En un estudio controlado se evaluaron 33 muestras de semen humano, encontrando que tanto la congelación lenta como la vitrificación tuvieron resultados similares, siendo esta última más rápida, más fácil y fue asociada a toxicidad y costos más bajos ²⁴.

Entre las fortalezas de nuestro estudio se encuentra que es un estudio prospectivo, en el cual se incluyeron 51 pacientes que acudieron al Centro Universitario de Medicina Reproductiva del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” tanto por problemas de fertilidad, así como para conocer su potencial reproductivo. Se incluyeron muestras de pacientes normozoospermicos, así como con oligozoospermia, lo cual permitió tener un panorama más amplio sobre los diferentes escenarios y la utilidad de los diferentes medios y métodos de congelación, en ambos grupos de pacientes que pudieran llegar a necesitar criopreservar su muestra de semen, ya que la mayor parte de los estudios previos se centraron en los resultados obtenidos posterior a la descongelación del semen en muestras de pacientes normozoospermicos, a diferencia de la población más comúnmente afectada.

Otra de las fortalezas del estudio es la eliminación del sesgo inter operador, ya que tanto las muestras basales como las muestras post descongelación utilizando los diferentes métodos y medios de congelación, se procesaron por una misma persona y basándose en los mismos parámetros espermáticos.

Las perspectivas de este estudio incluyen realizar evaluaciones enfocadas únicamente en pacientes con alteraciones en la calidad de la muestra, así mismo hacer el análisis comparativo de las variables morfocinéticas utilizando un sistema de análisis de esperma asistido por computadora (CASA) y además se propone valorar el índice de fragmentación

del DNA posterior a la descongelación, con el propósito de determinar si existe relación entre el método de congelación y los resultados reproductivos.

CAPITULO X

10. CONCLUSIÓN

En general, se observó una mejor recuperación espermática con la implementación de la congelación lenta utilizando el medio Freezing Medium TYB, comparada con las otras técnicas utilizadas en este estudio y el medio Sperm Freezing Medium al realizar la comparación, sin tomar en cuenta la concentración espermática inicial. Esto implica que es una buena alternativa en pacientes que se someterán a tratamientos o padecen alguna enfermedad que pone en riesgo su potencial reproductivo

Sin embargo, estos resultados no fueron constantes al subdividir la muestra en base a la concentración. En el subgrupo de muestras con oligozoospermia (≤ 15 millones/ml) se observó una mayor recuperación de espermatozoides utilizando congelación lenta independientemente del medio utilizado. En base a estos hallazgos no se considera costo-efectiva en este subgrupo de muestras, por lo que su utilización no estaría justificada. Este es un hallazgo, que, aunque no estaba contemplado en los objetivos vale la pena reportar. La importancia de estos hallazgos radica en no utilizar en forma rutinaria el medio de congelación Freezing Medium TYB como parte de los tratamientos de reproducción asistida, al no haber un beneficio significativo con su implementación en muestras con oligozoospermia.

Así mismo este resultado debe ser tomado con cautela, ya que el estudio no estaba diseñado específicamente para un subgrupo particular de pacientes, por lo que se necesitaría en un futuro realizar un estudio enfocado en pacientes con oligozoospermia.

Al evaluar cada uno de los parámetros del espermograma vitalidad, motilidad total y progresiva, con excepción de concentración total de espermatozoides recuperados, se observó una menor disminución en la vitalidad, motilidad total y progresiva recuperada respecto a la basal con la implementación de la congelación lenta con el medio Freezing Medium TYB.

Esto pudiera implicar que la congelación lenta no es tan agresiva como se creía en términos de vitalidad, motilidad total y progresiva recuperada, a diferencia de lo publicado previamente respecto al daño atribuido a la congelación lenta

Finalmente podemos concluir que por un lado la congelación lenta es uno de los métodos más viejos de congelación de semen, que es un proceso laborioso, por lo que previamente ha llevado a la búsqueda de alternativas que pudieran llegar a implementarse con la finalidad de tener mejores resultados en términos de mayor recuperación de espermatozoides con menor daño. Sin embargo, la congelación lenta es una de las técnicas mejor dominadas en el área de reproducción, que como se demostró en este estudio presenta una mejor recuperación de espermatozoides, así como un menor daño en su vitalidad y motilidad, por lo que hoy por hoy la congelación lenta sigue siendo una excelente opción en términos de preservación de semen.

CAPITULO XI

11. ANEXOS

11.1 Aprobación del Comité de Ética en Investigación



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

DR. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Investigador Principal
Departamento de Ginecología y Obstetricia.
Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
Presente.-

Estimado Dr. Morales:

En respuesta a su solicitud con número de ingreso **PI21-00172** con fecha del **19 de mayo del 2021**, recibida en las oficinas de la Secretaría de Investigación Clínica de la Subdirección de Investigación, se extiende la siguiente notificación con fundamento en el artículo 41 BIS de la Ley General de Salud; los artículos 14 inciso VII, 99 inciso I, 102, 109 y 112 del Decreto que modifica a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud publicado el día 2 de abril del 2014; además de lo establecido en los puntos 4.4, 6.2, 6.3.2.8, 8 y 9 de la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos; así como por el Reglamento interno de Investigación de nuestra Institución.

Se le informa que el Comité a mi cargo ha determinado que su proyecto de investigación clínica abajo mencionado cumple con los aspectos éticos necesarios para garantizar el bienestar y los derechos de los sujetos de investigación que la sociedad mexicana demanda, por lo cual ha sido **APROBADO**.

Titulado **"Evaluación de la recuperación de espermatozoides criopreservados mediante congelación lenta vs vitrificación en microgotas."**

De igual forma el siguiente documento:

- Protocolo escrito en extenso, versión 3.0 de fecha Junio 2021.

Por lo tanto usted ha sido **autorizado** para realizar dicho estudio en el **Departamento de Ginecología y Obstetricia** del Hospital Universitario como Investigador Responsable. Su proyecto aprobado ha sido registrado con la clave **GI21-00013**. La vigencia de aprobación de este proyecto es al día **02 de julio del 2022**.

Participando además la Dra. Lorena Chrissie Ocegüera Palao como **tesista**, la Dra. Selene M. García Luna, QBP. Lilieth Villarreal Pineda, Dra. Dahlia T. Haro Anaya, Dr. Otto Hugo Valdés Martínez, Dr. Luis Humberto Sordia Hernández, Dra. Sci. Geraldina Guerrero González y la Est. Ana Paula Cedillo Baladrán como Co-Investigadores.

Toda vez que el protocolo original, así como la carta de consentimiento informado o cualquier documento involucrado en el proyecto sufran modificaciones, éstas deberán someterse para su re-aprobación.

Será nuestra obligación realizar visitas de seguimiento a su sitio de investigación para que todo lo anterior se encuentre debidamente consignado. En caso de no apegarse, este Comité tiene la autoridad de suspender temporal o definitivamente la investigación en curso, todo esto con la finalidad de resguardar el bienestar y seguridad de los sujetos en investigación.

El proyecto aprobado será revisado:

1. Al menos una vez al año, en base a su naturaleza de investigación.

Comité de Ética en Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México.
Teléfonos: 81 8329 4050, Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduanl.com



11.1 Aprobación del Comité de Ética (continuación)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

2. Cuando cualquier enmienda pudiera o claramente afecte bienestar y los derechos de los sujetos de investigación o en la conducción del estudio.
3. Cualquier evento o nueva información que pueda afectar la proporción de beneficio/riesgo del estudio.
4. Así mismo llevaremos a cabo auditorias por parte de la Coordinación de Control de Calidad en Investigación aleatoriamente o cuando el Comité lo solicite.
5. Toda revisión será sujeta a los lineamientos de las Buenas Prácticas Clínicas en Investigación, la Ley General de Salud, el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, la NOM-012-SSA3-2012, el Reglamento Interno de Investigación de nuestra Institución, así como las demás regulaciones aplicables.

Atentamente,
"Alere Flammam Veritatis"
Monterrey, Nuevo León, a 02 de julio del 2021



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

DR. med. **JOSE GERARDO GARZA LEAL**
Presidente del Comité de Ética en Investigación

Comité de Ética en Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. González Gallo, Col. Miras Centrales, C.P. 64460, Monterrey, N.L., México
Teléfonos: 01 8329 4050, Ext. 2870 a 2874, Correo Electrónico: investigacionclinica@meduanl.com



11.2 Cuestionario de congelación de espermatozoides

CUESTIONARIO congelación de espermatozoides	
ID Protocolo: _____	
ID Muestra: _____	
Fecha: _____	
Nombre de la paciente: _____	Edad: _____
	Peso: _____
	Talla: _____
Nombre: _____	Edad: _____
	Peso: _____
Días de abstinencia: _____	Talla: _____
Hora de recolección: _____	
1.- Tiene hermanos?	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
2.- Familiares con problemas de fertilidad?	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
	Cual: _____
3.- Diagnóstico previo de problemas de fertilidad?	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
	Cual: _____
4.- Cirugías previas?	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
	Cual: _____
5.- Problemas para eyacular?	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
	Cual: _____
6.- Problemas para mantener la erección?	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
	Cual: _____
7.- Trauma genital?	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
	Cual: _____
8.- Padece alguna enfermedad?	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
	Cual: _____
9.- Toma algún medicamento?	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
	Cual: _____
10.- A que se dedica? _____	
11.- Dura mucho tiempo sentado?	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
12.- Fuma?	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
	Frecuencia: _____
13.- Toma?	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
	Frecuencia: _____
14.- Utiliza algún tipo de drogas?	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
	Cual: _____
	Frecuencia: _____

CAPITULO XII

12. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Infertility. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility> (2020).
2. Babakhanzadeh, E., Nazari, M., Ghasemifar, S. & Khodadadian, A. Some of the factors involved in male infertility: A prospective review. *International Journal of General Medicine* (2020)
doi:10.2147/IJGM.S241099.
3. Schulz, M. *et al.* Human sperm vitrification: A scientific report. *Andrology* vol. 8 (2020).
4. Pabón, D. *et al.* A new system of sperm cryopreservation: evaluation of survival, motility, DNA oxidation, and mitochondrial activity. *Andrology* Volume7, Issue3, May 2019. Pages 293-301.
<https://doi.org/10.1111/andr.12607>
5. Schuster, T. G., Keller, L. M., Dunn, R. L., Ohl, D. A. & Smith, G. D. Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. *Human Reproduction*, Volume 18, Issue 4, April 2003, Pages 788–795, <https://doi.org/10.1093/humrep/deg162>
6. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>.

7. Palomar Rios, A. & Molina Botella, I. Sperm parameters that play a major role in the assessment of semen quality after cryopreservation. *J. Assist. Reprod. Genet.* **34**, 1271–1276 (2017).
8. Liu, S. & Li, F. Cryopreservation of single-sperm: Where are we today? *Reprod. Biol. Endocrinol.* **18**, 1–12 (2020).
9. Fabozzi, G. *et al.* Evaluation of the Efficiency of Two Different Freezing Media and Two Different Protocols to Preserve Human Spermatozoa from Cryoinjury. *Int. J. Reprod. Med.* **2016**, 1–6 (2016).
10. Stanic, P. *et al.* Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **91**, 65–70 (2000).
11. Hezavehei, M. *et al.* Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod. Biomed. Online* **37**, 327–339 (2018).
12. Slabbert, M., du Plessis, S. S. & Huyser, C. Large volume cryoprotectant-free vitrification: An alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia* **47**, 594–599 (2015).
13. Hu, H. *et al.* Comparison of rapid freezing versus vitrification for human sperm cryopreservation using sucrose in closed straw systems. *Cell Tissue Bank.* **21**, (2020).
14. Raad, G. *et al.* Cryopreservation media differentially affect sperm motility, morphology and DNA integrity. *Andrology* **6**, 836–845 (2018).
15. Nallella, K. P., Sharma, R. K., Allamaneni, S. S. R., Aziz, N. & Agarwal, A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two

- cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertil. Steril.* **82**, 913–918 (2004).
16. Riva, N. S., Ruhlmann, C., Iaizzo, R. S., López, C. A. M. & Martínez, A. G. Comparative analysis between slow freezing and ultra-rapid freezing for human sperm cryopreservation. *J. Bras. Reprod. Assist.* **22**, 331–337 (2018).
 17. Abdelhafez, F. F., Desai, N., Abou-Setta, A. M., Falcone, T. & Goldfarb, J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: A systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2010 Feb;20(2):209-22. doi: 10.1016/j.rbmo.2009.11.013.
 18. Zhou, D. *et al.* Improving native human sperm freezing protection by using a modified vitrification method. *Asian J. Androl.* **23**, 91–96 (2021).
 19. Gentamicin, F. Freezing Medium - TYB with Glycerol & Gentamicin. *Irvinesci.com* (2021). at <<https://www.irvinesci.com/freezing-medium-tyb-with-glycerol-gentamicin.html>>
 20. Sperm Freezing Medium. *CooperSurgical Fertility Companies* | (2021). at <https://fertility.coopersurgical.com/art_media/sperm-freezing-medium/>
 21. Aizpurua, J. *et al.* New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Hum. Reprod.* **32**, 2007–2015 (2017).
 22. O'Neill, H. C., Nikoloska, M., Ho, H. T., Doshi, A. & Maalouf, W. Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification: comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage. *J. Assist. Reprod. Genet.* **36**, 1713 (2019).
 23. Karthikeyan, M., Arakkal, D., Mangalaraj, A. & Kamath, M. Comparison of

Conventional Slow Freeze versus Permeable Cryoprotectant-Free
Vitrification of Abnormal Semen Sample: A Randomized Controlled Trial.

J. Hum. Reprod. Sci. 12, 150–155 (2019).

24. Tao, Y., Sanger, E., Saewu, A. & Leveille, M.-C. Human sperm vitrification: the state of the art. *Reproductive Biology and Endocrinology* Vol.18, No: 17 (2020). doi:10.1186/s12958-020-00580-5.
25. Li, Y.-X. *et al.* Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **233**, 84–92 (2019).

CAPITULO XIII

13. RESUMEN AUTOBIBLIOGRÁFICO

Lorena Chrissie Ocegüera Palao

Candidata para el grado de Subespecialidad en Biología de la
Reproducción Humana

Tesis: EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES
CRIOPRESERVADOS MEDIANTE CONGELACIÓN LENTA VS
VITRIFICACIÓN EN MICROGOTAS

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Tijuana, Baja California el 21 de enero de 1986,
hija de Cristina Palao Rincón (Médico Pediatra) y Eugenio Ocegüera López
(Médico Pediatra).

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Baja California
obteniendo el grado de Médico en el 2014.

Especialidad de Ginecología y Obstetricia en el Instituto Mexicano del Seguro
Social, avalada por la Universidad de Monterrey en el 2020.

Experiencia profesional: Residente de Segundo año (2/2) de la Subespecialidad
de Biología de la Reproducción Humana en el Hospital Universitario "Dr. José
Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

CAPITULO XIV

14. ABSTRACT

Sperm freezing is generally performed to preserve patients' sperm that undergoes assisted reproductive techniques, such as donor insemination patients who want and need to preserve their sperm before undergoing gonadotoxic treatment, that includes chemo and radiotherapy treatment. There are various techniques to sperm freezing; however, cryopreservation procedures decrease the vitality and motility of sperm.

Therefore, in this study, the sperm retrieval efficiency after thawing will be evaluated with two different techniques (slow freezing and microdrop vitrification) using two commercial freezing medias.

Objective: Compare the sperm retrieval efficiency by microdrop vitrification and slow freezing with two commercial freezing medias.

Material and Methods: A prospective, comparative and observational study was conducted; the study. Included male patients between the ages of 25 to 50 who attended Centro Universitario de Medicina Reproductiva "Dr. José Eleuterio González", UANL during the period from July 2021 through October 2021.

The initial and post-freezing semen evaluation was conducted following World Health Organization (WHO) guidelines, from which the sperm retrieval efficiency was calculated. In this study, two freezing methods were compared; slow freezing and microdrop vitrification, as well as two commercial freezing medias; Sperm Freezing medium and Freezing medium TYB.

Results: The efficiency of sperm retrieval by slow freezing was higher with Freezing medium TYB compared to any other freezing methods, as well as Sperm Freezing medium. On the other hand, no statistical difference was observed between microdrop vitrification and conventional vitrification.

Conclusions: Slow freezing was associated with better sperm retrieval compared to microdrop and conventional vitrification, with Freezing Medium TYB, similarly, the same pattern was observed in favor of slow freezing when evaluated each parameter of the spermogram, vitality, total and progressive motility, with the exception of total sperm concentration, where no difference was observed according to the freezing medium used, this suggests that it is a good option in patients undergoing treatment or suffering a disease that puts them in a potential reproductive risk.

Key words: Sperm retrieval, cryopreservation, sperm freezing, slow freezing, microdrop vitrification.