

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 700 4814
Fax in U.S.A.: (1-305) 675 7743

Señor Director
DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-054828-A-00007-0000

Fecha: 2011-03-28 16:27:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 15

Trámite : 011
Evento : 379
Actuación : 329

Referencia : Expediente No. 03.054.828 A
Asunto : Solicitud de patente para **DISPOSICION DE SEPARAR ESPERMATOZOIDES CONGELADOS EN POBLACIONES QUE CONTIENEN CROMOSOMAS X y CROMOSOMAS Y**
Solicitante : **XY, LLC**
Fecha de Solicitud : 27 de junio de 2003

1. Yo, Luz Clemencia DE PAEZ, obrando como apoderada del solicitante en el asunto antes identificado, respetuosamente manifiesto que dando alcance al memorial radicado en su Despacho el 4 de febrero de 2011 mediante el cual se dio respuesta al Oficio No.14756 notificado por fijación en lista el 12 de noviembre de 2010, solicito a su Despacho tener en cuenta las siguientes modificaciones y argumentos al momento de continuar el estudio de fondo de la presente solicitud:

Inicialmente, y de acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito presentar un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 9 reivindicaciones, las cuales corresponden a las mismas reivindicaciones radicadas junto con el memorial de respuesta al Oficio No.6424, radicado el 21 de septiembre de 2010 y por ende, no amplían la materia revelada en la solicitud inicial.

Por lo tanto, solicitamos atentamente tener en cuenta este nuevo pliego reivindicatorio para efectos del Examen a realizar por el Examinador.

Finalmente deseamos poner de presente, que a pesar de que en el nuevo pliego reivindicatorio no se incluyó materia inicialmente reivindicada, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud, beneficiándose de la fecha de prioridad inicialmente reivindicada.

De otro lado, con respecto a las objeciones planteadas por su Despacho deseamos poner de presente los siguientes argumentos, los cuales consideramos demuestran el nivel inventivo de la presente solicitud:

El Examinador afirma que la anterioridad D1 "enseña la forma de separar cromosomas X de cromosomas Y mediante un citómetro de flujo" y afirma que el ejemplo 1 de dicha anterioridad "señala la forma de tinción de células de esperma mediante su incubación a 38µm de colorante Hoechst 3342 por una hora a 34°C" y continua afirmando que existen pequeñas diferencias en las condiciones de tinción bajo las que se realiza el método de la presente invención en comparación con el método de la anterioridad y que por lo tanto, la presente invención carece de nivel inventivo.

Con respecto a lo anterior deseamos poner de presente que en la presente invención se enseña un método de tinción, para semen congelado que ha sido descongelado, que usa un procedimiento de tinción modificado que se ha optimizado para las diferencias causadas por el proceso de tinción. En el presente procedimiento, en general la cantidad de Hoechst 33342 requiere una mayor concentración, dejando por fuera el rango de concentración de Hoechst 33342 usado en D1 (38µm), debido a que se usa una cantidad mayor a 40µm hasta una concentración tan alta como 2500µm. El tiempo de tinción para la presente invención es en general más largo que el tiempo de D1 (1 hora), ya que se usa un tiempo en un rango de entre 50 minutos a 200 minutos.

Así, una persona versada en la materia estaría consciente que no existe una sobreposición de ninguna de las dos condiciones anteriores, cuando son tenidas en cuenta en conjunto, ya que se esperaría que a una más alta concentración de colorante se necesitaría menor tiempo para que el colorante fuera absorbido, es decir a 60 minutos con una concentración de 38µm en comparación con 50 minutos a una concentración de 40µm corresponderían en efecto a condiciones similares. Sin embargo, es importante aclarar que lo anterior corresponde solamente al rango inferior de la presente invención y que de esta manera, se debe tener en cuenta que en la presente invención se extiende dicho rango mucho más allá del alcance del rango de D1.

Adicionalmente, en cuanto a la afirmación del Examinador con respecto a que "los experimentos llevados a cabo en D1 (Ejemplos 1, 2 y 3) involucran el congelamiento y descongelamiento del semen con fines de transporte, dicho mecanismo por lo tanto es normal en el estado de la técnica antes o después de la tinción" (subrayado fuera de texto), respetuosamente aclaramos que la invención no se refiere al transporte y que un experto en la materia no supondría que la tinción de semen congelado y posteriormente descongelado se llevaría a cabo tan eficientemente (si es que se realizara) como la tinción de semen fresco sin congelar mediante el uso de los mismos procedimientos.

Sin embargo, teniendo en cuenta las afirmaciones del Examinador, deseamos poner de presente lo siguiente con respecto a los Ejemplos 1, 2 y 3 de D1:

- El ejemplo 1 utiliza semen recién extraído (columna 15, línea 2), que se tiñe y se separa (columna de 15 líneas 3 y 4) y utiliza dos controles no separados y no teñidos de semen, un control de congelado/descongelado y un control líquido de semen fresco (columna de 15 líneas de 35 a 45), de los cuales ninguno de los dos se encuentra teñido. De esta manera, el Ejemplo 1 no revela la tinción de los el semen congelado y posteriormente descongelado.
- El Ejemplo 2 utiliza semen no separado no congelado fresco, que se congela y se descongela. (Columna 15 la última línea y la columna 16 la primera línea). De esta

manera, el Ejemplo 2 no revela la tinción de los el semen congelado y posteriormente descongelado.

- En el Ejemplo 3 se usa semen fresco no congelado que se tiñe y separa (Columna 16, líneas 27 a 31). En ningún momento se congela el semen separado, se mantiene a 5 °C (Columna 16, líneas 37 a 41). De esta manera, el Ejemplo 3 no revela la tinción de los el semen congelado y posteriormente descongelado.

- Finalmente, y en aras de la exhaustividad, el Ejemplo 4 usa semen no separado fresco y no congelado (Columna 17, líneas 25 a 30). De esta manera, el Ejemplo 4 no revela la tinción del semen congelado y posteriormente descongelado.

Por lo tanto, ninguno de los ejemplos de D1 (y en ninguna parte del documento) se enseña la tinción de semen comprometido con el proceso de congelado y posterior descongelado del mismo.

En consecuencia, el congelamiento y descongelamiento del semen con fines de transporte antes de la tinción no es revelado en D1, así como tampoco se revela el congelamiento y descongelamiento del semen con fines de transporte después de la tinción del mismo, tal como lo había afirmado el Examinador.

Así las cosas, las características técnicas esenciales a) y b) de la reivindicación principal de la presente invención no son reveladas en la anterioridad D1 y teniendo en cuenta que D1 no proporciona indicio alguno o sugerencia de usar una concentración de Hoechst 33342 que se encuentra dentro del rango de la reivindicación 1 o de teñir semen congelado y posteriormente descongelado es claro que la presente invención es inventiva frente a la anterioridad citada por el Examinador (D1).

Aún más, el Examinador afirma que "las diferencias en cuanto a las condiciones a las cuales se realiza el proceso de teñido, y de mantenimiento de las células no evidencian un salto sorprendente en la separación de cromosomas ya que se logra una eficiencia del 90%"; sin embargo, cabe aclarar que el Examinador está comparando la presente

invención con las enseñanzas de D1, las cuales demuestran una separación del 90% cuando se usa semen no congelado o fresco.

De lo anterior, deseamos llamar la atención del Examinador en cuanto a que la presente invención se enfoca solamente en la separación de semen que había sido previamente congelado y como se ha discutido, se diferencia del estado del arte anterior en que la anterioridad D1 se enfoca en semen no congelado.

En la presente solicitud se enseña que intentos anteriores de separar semen congelado-descongelado son limitadas y alcanzan purezas del 85% o inferiores (Véase página 4 de la descripción). Uno de los objetivos de la presente invención es separar semen, ya congelado que se ha descongelado posteriormente, a purezas mayores al 85% y alcanzando purezas tan altas como del 99% (Véase páginas 7 y 8 de la descripción). Lo anterior se encuentra reclamado en la reivindicación 7.

Finalmente, con respecto a la afirmación del Examinador referente a que “puesto que D1 divulgaba previamente la necesidad de separar espermatozoides que contienen cromosomas X de espermatozoides que contienen cromosomas Y y motivaban que cada población resultante tuviera un número significativo de espermatozoides separados de forma correcta e uniforme, una persona conocedora de la materia motivada por tal sugerencia lograría métodos presentados en la solicitud basándose en la enseñanzas de D1”.

Teniendo en cuenta el estado, deseamos aclarar que la anterior afirmación no tiene validez debido a las siguientes razones:

- D1 enseña la inseminación de los mamíferos con un bajo número de espermatozoides frescos sexado o no sexado, (columna 1, líneas 6 a 9 y la columna 15, líneas 50 a 54). El experto en la materia se daría cuenta de que a medida que un número bajo de espermatozoides se está utilizando desde el principio, será de suma importancia mantener la viabilidad de dichos bajos números de espermatozoides desde el principio. Así, con el fin de dar una

indicación de qué tan bajo es el número de espermatozoides, deseamos hacer énfasis en lo afirmado en la columna 15, líneas de 50 a 54, en donde D1 utiliza un control de líquidos que consta de 120 veces el número de espermatozoides en comparación con las dosis bajas de muestras experimentales utilizadas en D1;

- El estado del arte en el momento de la presentación de la presente solicitud puede ser ejemplificado mediante Hallak, et al (adjunta a este memorial), en donde se afirma que el semen pierde integridad de la membrana celular cuando es congelado y posteriormente descongelado bajo la presencia de crioprotectores, los cuales son indispensables para prevenir daño omótico durante el proceso de congelamiento. Así, una persona versada en la materia sabría que los crioprotectores se usan para aumentar la motilidad del semen, la viabilidad y para preservar la forma normal de las células cuando son congeladas. El proceso de descongelamiento requiere que se remuevan dichos crioprotectores, los cuales disminuyen la capacidad de fertilización del semen la que está asociada con su movilidad.

De esta manera, deseamos aclarar que una persona versada en la materia tratando de usar semen congelado-descongelado, y sabiendo la baja viabilidad asociada con el proceso de congelamiento, consideraría como poco probable esperar que el proceso de tinción de la anterioridad D1, el cual es diseñado para semen fresco sin congelar, funcionara con un nivel significativo de éxito en semen que ha sido congelado y comprometido, debido a que los procesos de congelamiento y descongelamiento crean estrés y debilitan la membrana celular de los espermatozoides.

En consecuencia, consideramos que la reivindicación 1 y sus dependientes implican una actividad inventiva a la luz de las diferencias entre D1 y la presente invención.

2. Así entonces, mi representada reitera que no puede estar de acuerdo con la metodología adelantada para estudiar el nivel inventivo de la presente invención. Lo anterior porque las enseñanzas de la anterioridad D1 no llevan a un técnico versado en la materia a obtener la materia acá reivindicada.

3. Por lo tanto, teniendo en cuenta que D1 no revela ni sugiere las características esenciales de la presente invención y/o que en dicho documento no existe enseñanza o sugerencia que permitiera obtener la misma, el solicitante respetuosamente reitera su petición de que se otorgue la presente solicitud.

4. ANEXOS

- Cryopreservation of Human Spermatozoa: Comparisson of TEST-Yolk Buffer and Glycerol, Hallak et al, In J Fertil, 45 (1), 2000 pág 38-42
- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 9 reivindicaciones.
- Formulario para modificaciones.

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
CC. 35.456.344 de Usaquén
T.P.A. No. 23.555

 COLO-17983-845-002-3
COLO-17983-847-002-1
COLO-13534-841-004-8
DVF\DV\FID-189553\WPC17983
No. M-2011-189553\DV F



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1

SOLICITUD DE:

☐ Corrección de Error Material

☒ Modificación a una solicitud

2

SOLICITANTE

Nombre: XY, LLC.

Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: 22575 State Highway 6 South, Navasota, Texas 77868, Estados Unidos de América

Domicilio: Navasota, Texas, Estados Unidos de América

Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70

E-mail: clientes@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

3

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: Luz Clemencia de PAEZ

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35

Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11

E-mail: cavelier@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número: 35.456.344 TP 23.555

4

Número de expediente:

03.054.828 A

5

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 9 reivindicaciones con el fin de superar las objeciones hechas por Su Despacho a la presente solicitud de patente y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.

6

Comprobante de pago No. _____

Fecha: _____

7

Anexos

☐ Comprobante de pago de la tasa por \$118.000, por concepto de modificaciones.

☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por.

☐ Poderes, si fuere el caso

☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

8

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA: 

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P.A. 23.555

DVF

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar células de esperma deseadas, que comprende las etapas de:

a. obtener células de esperma por medio de descongelar semen previamente congelado;

b. incubar las células de esperma con colorante fluorocromo en una concentración micro-molar de entre 40 y 2500 por entre 50 y 200 minutos;

c. suministrar dichas células de esperma a un citómetro de flujo;

d. crear un entorno de fluido de envainado dentro de dicho citómetro de flujo en el cual dichas células de esperma están retenidas;

e. pasar dichas células de esperma a través de una boquilla mientras están retenidas en dicho entorno de fluido de envainado pasando a través de un sistema de detección;

f. excitar dichas células de esperma con una fuente de radiación;

g. detectar la magnitud de la fluorescencia emitida por el enlace fluorocromo al ADN del esperma con una disposición sensora de células de esperma que responde a dichas células de esperma; y

h. separar dichas células de esperma que tienen una característica deseada, basándose en la magnitud de fluorescencia emitida por cada una de las células, con una disposición de separación y discriminación.

2. El método para aislar células de esperma deseadas, tal como se define en la reivindicación 1, donde dichas células de esperma obtenidas descongelando semen previamente congelado son obtenidas de mamíferos machos seleccionados del grupo de mamíferos que consiste de primates, humanos, porcinos, ovinos, bóvidos, equinos, cánidos, felinos y delfines.

3. El método para aislar células de esperma deseadas, tal como se define en la reivindicación 2, donde dicho mamífero macho comprende dicho bóvido y donde dicha concentración micro-molar de colorante fluorocromo es 224.

4. El método para aislar células de esperma deseadas, tal como se define en la reivindicación 2, donde dicho mamífero macho comprende dicho bóvido y donde dicha concentración micro-molar de colorante fluorocromo es 2240.

5. El método para aislar células de esperma deseadas, tal como se define en la reivindicación 3, donde dicho tiempo de duración es de 190 minutos.

6. El método para aislar células de esperma deseadas, tal como se define en la reivindicación 5, donde dicho tiempo de duración es de 60 minutos.

7. El método para aislar células de esperma deseadas, tal como se define en las reivindicaciones 1, 3, ó 7, donde dichas células de esperma que contienen cromosomas X son diferenciadas de las células de esperma que contienen cromosomas Y en base a la magnitud de fluorescencia en un rango mayor de 85%, que es un rango seleccionado del grupo consistente en el 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

8. El método para aislar células de esperma deseadas, tal como se define en la reivindicación 7, que comprende además un elemento de recolección dentro del cual están aisladas las células de esperma que contienen cromosomas X.

9. El método para aislar células de esperma deseadas, tal como se define en la reivindicación 7, que comprende además un elemento de recolección dentro del cual están aisladas las células de esperma que contienen cromosomas Y.

Cryopreservation of Human Spermatozoa: Comparison of TEST-Yolk Buffer and Glycerol

*Jorge Hallak, M. D.
Rakesh K. Sharma, Ph.D.
Cheryl Wellstead, M.T.
Ashok Agarwal, Ph.D.*

Andrology Research and Clinical Laboratories
Department of Urology
The Cleveland Clinic Foundation
Cleveland, Ohio

ABSTRACT

Objective-Comparison of human sperm motility, morphology, and sperm membrane integrity using two cryoprotective media, Test-yolk buffer with glycerol and glycerol alone.

Methods-Semen samples from 10 healthy donors were divided and frozen with either glycerol or a combination of glycerol and TEST-yolk buffer. Semen characteristics were evaluated before freezing and after thawing. Motility was measured at 0, 60, 120, and 180 minutes postthaw following removal of the cryoprotectant (post-wash).

Results-Percentage of motile sperm decreased significantly compared to prefreeze values in both groups. Post-thaw motility following removal of the freezing media was higher in specimens that were frozen in TEST-yolk buffer compared to those frozen in glycerol at 0 minutes ($P = 0.004$). Similarly, specimens cryopreserved in TEST-yolk buffer had higher sperm motility compared to aliquots that were frozen in glycerol at 180 minutes ($P = 0.013$). The percentage of normal sperm forms was significantly higher post-wash and post thaw in specimens that were cryopreserved in TEST-yolk buffer ($P = 0.04$).

Conclusions-Sperm cryopreserved in TEST-yolk buffer had significantly better motility, morphology, and sperm membrane integrity than sperm preserved in glycerol alone. Int J Fertil 45(1):38-42, 2000

KEY WORDS: spermatozoa, cryopreservation, egg yolk, glycerol, morphology

INTRODUCTION

Use of a cryoprotective agent is indispensable to prevent injury to human spermatozoa during the cryopreservation process. However, addition of a cryopreservative agent during the freezing process, plus its removal during the thawing process, lowers its fertilizing capacity by damaging cell membranes and lowering sperm motility [1-3]. The damage results in part from osmotic injury as a result of the permeating cryopreservative, and occurs when the cryoprotectant enters the cells before freezing and also when it is removed during thawing [4-6].

Sperm cells are highly permeable to glycerol [7-11]. To protect cells from osmotic injury, glycerol, a cryoprotectant, is often extended with cryobuffers, such as citrate or egg yolk, which contain nonpermeating macromolecules. A promising cryobuffer is TEST-yolk buffer, a combination of TES and Tris (designated as TEST) together with fresh egg yolk (20%), 11 mM dextrose, and 1 % penicillin-streptomycin. The buffering agent in TESTyolk is a zwitterion consisting of 21 mM TES [N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid, $pK = 7.5$], and 96 mM Tris [(hydroxymethyl) aminomethane].

In this study, we compare two cryopreservative media, TEST-yolk buffer with 15% glycerol and glycerol 6% mixed with ejaculate. Sperm motility, viability, morphology, and cell membrane integrity of sperm cryopreserved with each medium were measured.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

This study was approved by the Institutional Review Board. Ten healthy normal donors were selected on the basis of a normal semen analysis according to the World Health Organization (WHO) classification [12].

Assessment of Semen Characteristics and Semen Cryopreservation

Semen samples were collected by masturbation after 48 to 72 hours of sexual abstinence.

After liquefaction, total sperm count and percentage motility were measured manually on an Olympus BH2-S microscope with a x 20 positive phase-contrast objective. For each measurement, a 5- μ L sample aliquot was loaded on a 20- μ L counting chamber (MicroCell, Conception Technologies, La Jolla, CA). After initial semen analysis, the specimen was divided into two equal aliquots. One aliquot was cryopreserved with glycerol alone (6% vol/vol in ejaculate). The second aliquot was cryopreserved with TEST-yolk buffer (with glycerol 15% vol/vol) using the liquid-nitrogen vapor-freezing technique [13]. An aliquot of the freezing medium equal to 25 % of the original specimen volume was added to the specimen, which was gently mixed for 5 minutes. This step was repeated four times to give a final semen-to-medium ratio of 1:1. The mixed aliquots were frozen in cryogenic vials using a three-stage freezing procedure: exposure to -20°C for 8 minutes, exposure to -76°C for 2 hours, and, finally, immersion in liquid nitrogen at -196°C until analysis. For thawing, the specimen was held at room temperature for 5 minutes and then at 37°C for 20 minutes. Semen analysis was done on the unwashed specimens and following removal of the cryoprotective media by washing and resuspending in 1.0 mL of human tubal fluid (postwash). After thawing, postwash specimens were analyzed for percentage motility at 0, 60, 120, and 180 minutes.

Assessment of Sperm Viability and Morphology

Prefreeze viability was measured only in those specimens where the motility was $\leq 30\%$. The percentage of viable sperm in both TEST-yolk buffer and glycerol cryoprotectants in pre-freeze whole semen specimens and in postthaw, post-wash specimens was assessed by eosin-nigrosin staining. An aliquot from each sample was mixed with an equal volume of 0.05 % eosin-Y-nigrosin to improve contrast. After two minutes' incubation, slides were viewed under light microscopy at 400x. A total of 100 spermatozoa in duplicate from each sample were counted. Dead sperm appear pink; sperm without dye were counted as viable.

For morphological evaluation, air-dried seminal smears were stained with Giemsa stain (Diff-Quik, Baxter Scientific Products, McGaw Park, IL). Sperm morphology was assessed in prefreeze whole semen specimens and in postthaw, post-wash specimens by both World Health Organization guidelines (WHO, 1992) and Kruger's strict criteria [14]. Sperm smears were stained with Giemsa stain (Diff-Quick).

Hypoosmotic Swelling

One milliliter of hypo-osmotic solution (150 mOsm/L; 0.025 mM sodium citrate and 0.075 mM D[-]-fructose) was added to 0.1 mL sperm suspension obtained from prefreeze whole semen specimens and in postthaw, postwash specimens. After incubation at 37°C for 60 minutes, a minimum of 200 spermatozoa per sample were examined by phase-contrast microscopy (Olympus, Model BH 2, Tokyo, Japan), and the percentage of sperm with intact membranes was calculated [13].

Bovine Cervical Mucus Penetration

The bovine cervical mucus penetration test was performed using the Penetrak kit (Serono Diagnostics, Allentown, PA) [13]. Capillary tubes in duplicate were thawed at room temperature for 30 minutes and snapped at the red score mark above the mucus meniscus. The cut end was placed in a plastic beaker containing 200 µL of sperm suspension obtained from prefreeze whole semen specimens and in postthaw, post-wash specimens and left at room temperature for 90 minutes. The capillary tubes were then placed on a calibrated slide and examined by phase contrast microscopy. The distance (in millimeters) covered by the vanguard sperm was measured.

Statistical Analysis

Data were analyzed using the paired t test. The Wilcoxon signed-rank test was used to compare differences in all the variables for prefreeze and postthaw specimens cryopreserved in glycerol or TEST-yolk media. Differences in postthaw variables were determined in specimens cryopreserved with glycerol and TEST-yolk. A P value of less than 0.05 was considered significant. The SAS statistical software package (SAS Institute, Cary, NC) was used for analyzing the data.

RESULTS

In the unwashed postthaw specimens, the percentage of motile sperm decreased significantly from prefreeze whole semen specimen values (median 43.5 %, interquartile range 21 %-77 %) in both TEST-yolk buffer [8, (6, 21); p = 0.00034] and glycerol [6 (0, 9)] (p = 0.0005). Results from prefreeze whole semen specimens and postthaw specimens in TEST yolk and glycerol media before and after washing are illustrated in Table I. The table also shows the differences in the various variables between specimens frozen in the two cryoprotective media. Postthaw motility after removal of the cryoprotectants was higher in TEST-yolk buffer specimens [10.5 (5, 25)] than in the glycerol specimens [5 (0.9, 10)] at 0 minutes (P < 004). Similarly, semen specimens cryopreserved in TEST-yolk buffer had higher motility at 180 minutes in postthaw, post-wash specimens.

TABLE I
Semen characteristics in prefreeze and in postthaw specimens cryopreserved in TEST-yolk buffer and in glycerol.

	Pre-freeze Sperm Characteristics	Time of Analysis	Post-thaw (post-wash)		P*	P†	P‡
			Test-yolk	Glycerol			
Motility (%)	43.5 (21,77)		8 (6,21)	6 (0,9)	0.0005	0.003	0.07
Motility (%)	44 (20, 67)	0 min	10.5 (5,25)	5 (0.9, 10)	0.0004	0.002	0.004
	44 (20, 67)	60 min	5.8 (3,22)	3.5 (0.9, 8.0)	0.0006	0.0005	0.05
	44 (20, 67)	120 min	5.8 (5, 14)	5 (3, 9)	0.0005	0.0004	0.92
	44 (20, 67)	180 min	6.5 (4.7,15.5)	2.5 (1.6, 3.5)	0.001	0.002	0.01
HOS (%)	96.5 (94, 97)		96 (93,98)	96 (94, 97)	0.37	0.59	0.36
BCMP (mm)	30.5 (20, 55)		11.5 (5.5, 2.5)	6 (3.6,13.5)	0.002	0.59	0.17
Eosin-nigrosin (%)			6 (4,9)	4 (2, 6)	----	0.0004	0.04
Morphology							
Kruger's criteria (%)	10.5 (7, 13)		4 (2, 7)	2.5 (2, 6.5)	0.001	0.0002	0.51
WHO method :							
Normal (%)	37.5 (37, 48)		25.5 (17, 30)	18.5 (10.5, 4)	0.0001	0.0003	0.004
Amorphous (%)	42 (30, 48)		29.5 (23, 37)	21 (26.5,39.5)	0.13	0.036	0.23
Round Cell (%)	3 (2, 7)		1.5 (0, 4)	1 (0,2)	0.011	0.05	0.37
Abnormal tails (%)	9.8 (7, 12)		37 (34, 40)	40 (34, 46)	0.0001	0.0001	0.13

All values are medians; 25% and 75% interquartile range in parentheses.
* Differences between pre-freeze and specimens cryopreserved in glycerol; P < .05 was significant.
† Differences between pre-freeze and specimens cryopreserved in TEST-yolk; P < .05 was significant.
‡ Differences between TEST-yolk buffer and glycerol; P < .05 was significant.
HOS = Hypo-osmotic swelling; BCMP = bovine cervical mucus penetration.

Sperm viability in postthaw, post-wash specimens was significantly greater in TEST-yolk buffer [6 (4, 9)] than in glycerol [4 (2, 6)] ($P < .04$). In the hypoosmotic swelling test, the postthaw and postwash specimens showed no difference between the two cryopreservatives, and percentages showing swelling of the tails were comparable with the percentage in prefreeze whole semen specimens. In the bovine cervical mucus test, the distance traveled by the vanguard sperm was significantly smaller in the washed specimens cryopreserved in glycerol alone compared to prefreeze whole semen specimens. Sperm morphology scored by both Kruger's criteria and the WHO method declined significantly after thawing in both groups following removal of the cryoprotectants ($P < .001$). However, the TEST-yolk buffer preserved normal sperm morphology [25.5 (17, 30)] significantly ($P < .004$) better than glycerol [18.5 (10.5, 24)] (Table I).

DISCUSSION

In the present study, we have shown that TEST-yolk buffer containing glycerol preserves significantly more sperm motility in post-thaw specimens than does glycerol alone. In addition, postthaw-postwash viability and the percentage of spermatozoa with normal forms by WHO criteria were significantly higher in specimens cryopreserved in TEST-yolk buffer than in glycerol alone.

Previous reports have shown that those cryopreserved in either medium alone had significantly lower values for semen characteristics than specimens cryopreserved in the combined medium [15,16]. However, we found that TEST-yolk buffer with glycerol preserves sperm functions better than glycerol alone. These results are in agreement with those reported by others [17-20], who did not include glycerol in their TEST-yolk buffer. The use of TEST-yolk buffer for semen cryopreservation results in a higher recovery of motile sperm [18]. It also improves capacitation and sperm penetration into zona-free hamster oocytes [19,20].

The mechanism by which TEST-yolk buffer functions is unclear. Alteration in phospholipid:cholesterol ratio of the sperm membrane or the egg-yolk lipids' alteration may stabilize sperm membranes by reducing damage to them caused by free radicals [21]. A macromolecular interaction between egg yolk and seminal plasma proteins is another likely mechanism, and TES and Tris components may also act synergistically with the egg yolk [22]. Finally, cryopreservation with added egg yolk may increase stability in the membrane enzyme system, acrosin/proacrosin.

The optimal concentration of glycerol for freezing human spermatozoa is from 2% to 10% [23]. Nevertheless, extensive osmotic injury is caused by the addition and removal of glycerol [15], and current procedures for cryopreservation of human spermatozoa generally limit the concentration of glycerol to less than 0.8 M. Sperm motility after cryopreservation generally declines by 30% to 40% [15]. Lower concentrations of glycerol might increase the fertile life span of cryopreserved sperm by decreasing the osmotic damage caused by the removal of glycerol. Differences in the abilities of different cryoprotectant media to support sperm survival and preserve their fertilizing capacity are due to differences in the glycerol concentration in each medium [16,23,24].

The use of TEST-yolk buffer has considerable clinical significance in diagnosing and treating male infertility. A short incubation of sperm with TEST-yolk buffer before *in vitro* fertilization can also increase the fertilizing potential of sperm [25]. TEST-yolk buffer can also be used as a storage medium in the shipment of specimens to other laboratories for the sperm penetration assay, and enables measurement of the functional integrity and fertilizing potential of the sperm [22]. In semen specimens with high viscosity, addition of TEST-yolk can improve sperm motility while permitting spermatozoa to undergo capacitation, yet block the acrosome reaction [26]. The extensive use of frozen spermatozoa in assisted reproductive techniques, together with the development of assisted fertilization using surgically retrieved spermatozoa, creates the need for additional studies to improve cryopreservation of human spermatozoa.

In summary, semen specimens cryopreserved in TEST-yolk buffer with glycerol had higher sperm motility, viability, and percentage of normal sperm forms than specimens cryopreserved in glycerol alone. TEST-yolk buffer combined with glycerol is a good cryopreservative for long-term storage of human spermatozoa.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported in part by a grant to Jorge Hallak from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Ministry of Science and Technology of Brazil), Brasília, Brazil.

REFERENCES

1. Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH: Cryopreservation of human semen-Comparison of cryoprotectives, sources of variability, and prediction of postthaw survival. *J Androl* 13:283-288, 1992.
2. Richter MA, Haning RV, Shapiro SS: Artificial donor insemination: fresh versus frozen semen: the patient as her own control. *Fertil Steril* 41:277-280, 1984.
3. Wong AW, Ho PC, Kwan M, et al: Factors affecting the success of artificial insemination by frozen donor semen. *Int J Fertil* 34:25-29, 1989.
4. Sherman JK: Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. *Fertil Steril* 24:397-412, 1973.
5. Mazur P, Schneider N: Osmotic responses of preimplantation mouse embryos and their clinical implications. *Cell Biophysics* 8:259-285, 1986.
6. Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, et al: Cryopreservation of human spermatozoa. BI. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril* 50:314-320, 1988.
7. Polge C, Smith AU, Parkes AS: Revival of /bovine/ spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666-669, 1949.
8. Sherman JK: Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying. *Fertil Steril* 14:49-64, 1963.
9. Gilmore JA, Liu J, Gao DY, et al: Determination of optimal cryoprotectants and procedures for the addition and removal from human spermatozoa. *Hum Reprod* 12:112-118, 1988.
10. Watson PF: The preservation of semen in mammals, in Finn CA (ed): *Oxford Review of Reproductive Biology*, vol I. Oxford University Press, Oxford, p 283, 1979.
11. Gao DY, Mazur P, Kleinhans FW, et al: Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. *Cryobiology* 29:657-667, 1992.
12. World Health Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 3rd ed. New York, Cambridge University Press, 1993.
13. Sharma RK, Tolentino MV, Jr, Agarwal A: Sperm kinematics of cryopreserved normozoospermic specimens after artificial stimulation. *Urology* 47:77-81, 1996.
14. Kruger TF, Menkveld R, Standers FS, et al: Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 46:1118-1123, 1986.
15. Gao DY, Liu J, Liu C, et al: Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod* 10:1109-1122, 1995.
16. Hammitt DG, Walker DL, Williamson RA: Concentration of glycerol required for optimal survival and in vitro fertilizing capacity of frozen sperm is dependent on cryopreservation medium. *Fertil Steril* 49:680-687, 1988.
17. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Kennedy W, et al: Comparison of glycerol and a zwitterion buffer system as cryoprotective media for human spermatozoa. Effect on motility, penetration of zona-free hamster oocytes, and acrosin/proacrosin. *J Androl* 5:1-7, 1984.
18. Ragni G, Lombroso GC, Caccamo A, et al: Enhanced quality of capacitated spermatozoa from oligoasthenozoospermic men after incubation in Test yolk medium. *Andrologia* 25:337-339, 1993.
19. Smith RG, Johnson A, Lamb D, et al: Functional tests of spermatozoa-sperm penetration assay. *Urol Clin North Am* 14:451-458, 1987.
20. Holmgren WJ, Jeyendran RS, Neff MR, et al: Preincubation of human spermatozoa in TEST-yolk medium: effect on penetration of zona-free hamster oocytes and correlation with other semen characteristics. *J In Vitro Fertil Embry Transf* 6:207-212, 1989.
21. Jones R, Mann T: Damage to the spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J Reprod Fertil* 50:261-268, 1977.
22. Jeyendran RS, Gunawardana VK, Barisic D, et al: TEST-yolk media and sperm quality. *Hum Reprod Update* 1:73-79, 1995.
23. Mahadevan M, Trounson AO: Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa. *Andrologia* 15:355-366, 1983.
24. Pries GS, Weidel L: A comparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa. *Fertil Steril* 46:147-149, 1986.
25. Katayama KP, Stehlik E, Roesler M, et al: Treatment of human spermatozoa with an egg yolk medium can enhance the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 52:1077-1079, 1989.
26. Johnson AR, Syms AJ, Lipshultz LJ, et al: Conditions influencing human sperm capacitation and penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 41:603-608, 1984.