



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **FACULTAD DE VETERINARIA**

Factores que afectan al proceso de criopreservación  
de los espermatozoides humanos

**D. Juan Carlos Martínez Soto**  
**2013**



Dr. D. Joaquín Gadea Mateos, Profesor Titular de Universidad del Área de Fisiología en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“Factores que afectan al proceso de criopreservación de los espermatozoides humanos”**, realizada por **D. Juan Carlos Martínez Soto**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de marzo de 2013



**JOAQUIN GADEA MATEOS PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA**

INFORMA:

Que **D. Juan Carlos Martínez Soto** es estudiante del programa de doctorado de la Universidad de Murcia (RD 778/1998) del bienio 2004/2006, denominado (09501) Biología de la Reproducción en los mamíferos, con Mención de Calidad del MEC curso 2004/2005.

Este alumno de doctorado ha desarrollado su proyecto de investigación bajo mi dirección científica y ha publicado con fecha posterior a la de aprobación de su proyecto de tesis doctoral (18 de octubre de 2007), tres artículos con unidad temática en revistas científicas indizadas en bases de datos internacionales de reconocido prestigio como Journal of Citation Reports y que a continuación se relacionan.

- **Martinez-Soto JC**, Hourcade JD, Gutiérrez-Adán A, Landeras JL, **Gadea J**. Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. *Asian J Androl*. 2010 May;12(3):431-41.
- **Martínez-Soto JC**, García-Vázquez FA, Gumbao D, Landeras J, **Gadea J**. Assessment of two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellets. *Cryobiology*. 2011 Dec;63(3):131-6.
- **Martinez-Soto JC**, Landeras J, **Gadea J**. Sperm and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*. Aceptado 11 octubre de 2012.

Por lo anteriormente descrito, este alumno de doctorado cumple los requisitos establecidos en el vigente Reglamento para los estudios de doctorado en la Universidad de Murcia para la presentación de la Tesis Doctoral como compendio de publicaciones.

Murcia a 15 de marzo de 2013

Fdo. Joaquín Gadea Mateos

**Dr. Joaquín Gadea Mateos**  
**Facultad de Veterinaria**  
**Departamento de Fisiología**

*Vivir no es sólo existir,  
sino existir y crear,  
saber gozar y sufrir  
y no dormir sin soñar.  
Descansar, es empezar a morir .*

**Gregorio Marañón**  
*(1887-1960) Médico y escritor español.*

## **Agradecimientos**

Con la presentación de este documento se completa una etapa que debió haber acabado hace ya algún tiempo. Lo habitual, lo normal, lo lógico es realizar los trabajos más arduos en la juventud, cuando las obligaciones laborales y familiares te permiten dedicar el tiempo necesario a tal menester. Por ello las tesis doctorales suelen realizarse a edades más tempranas, en caso contrario su realización supone un gran esfuerzo añadido. Esfuerzo que realmente merece la pena.

Durante la realización de esta tarea puedo asegurar con satisfacción que no he estado solo, sino apoyado por cierto número de personas a las que en estas breves líneas quiero mostrar mi más profundo agradecimiento. En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento y respeto a mi director de tesis el Dr. Joaquín Gadea, sin el cual, y sin querer parecer tópico, esta tesis doctoral no habría tenido ni principio ni fin. En estos años he podido aprender de él, trabajar con él y reír con él. Creo que no me equivoco al afirmar que he conseguido entre otras cosas ganar un amigo.

También durante estos años he podido aprender y colaborar con los integrantes de un gran grupo de investigación, el de Fisiología de la Reproducción, cuyas valías científica y personal están sobradamente demostradas. Agradezco a los integrantes de este grupo, los doctores Pilar Coy, Carmen Matas, Raquel Romar, Salvador Ruiz y Francisco García, los ánimos que me han dado y el haber conseguido que durante este tiempo me haya sentido en su departamento como en casa. Espero y deseo que, a partir de ahora, sigamos colaborando en temas de investigación y docencia durante muchos años.

No podría haber realizado esta tesis doctoral sin el decidido apoyo de mi empresa IVI MURCIA S.L. Empezando por el de su director el Dr. José Landeras que me ha facilitado el desarrollo de los diversos estudios que integran estos trabajos en las instalaciones del centro y ha incentivado desde el primer momento los distintos proyectos de investigación realizados en la clínica. Debo agradecer también a Verónica Martínez y Antonio Altuna, integrantes del laboratorio de Andrología de la clínica IVI Murcia, su ayuda en la realización de las numerosas congelaciones de muestras seminales que se han realizado durante esta tesis. Sin vuestra colaboración estos trabajos se habrían demorado indefinidamente.

A Fran y David Gumbao por su ayuda en la realización de parte de los análisis realizados en el trabajo sobre la descongelación en medio atemperado.

A Juan de Dios Hourcade y Alfonso Gutiérrez-Adán por su inestimable colaboración en la realización del test cometa. Sin ellos esta laboriosa determinación no se habría realizado.

Toca el momento de agradecer a mis padres María Soto y Adolfo Martínez, por haberme ayudado a conseguir lo que ni yo mismo pensaba alcanzar al iniciar mi andadura académica. Gracias por los esfuerzos realizados, por los ánimos aportados y por confiar en mí cuando el desanimo hacia mella. Nunca podré agradecer todos los sacrificios que durante muchos años habéis realizado. Sólo lamento que tú en estos momentos no puedas disfrutar conmigo de esta enorme satisfacción por eso allí donde estés, te lo dedico Adolfo.

A Carlos, un brillante muchacho, a Adolfo un diamante en bruto al cual agradezco que haya luchado por seguir con nosotros y a Javier un encantador y embaucador niño que con su imaginación y sus ocurrencias nos recuerda día a día lo importante que es no perder parte del niño que todos llevamos dentro. Mis hijos, a los cuales debo recompensar por las horas pasadas delante del ordenador, pero a los que espero haber demostrado que el esfuerzo suele ser recompensado al menos con la más grande de las satisfacciones, la personal.

Y por último, aunque no en orden de importancia, Isabel, por tu comprensión, tu ayuda, tus consejos y por haber soportado mis innumerables cambios de humor, gracias por soportarme día a día, ya sé que es difícil. Sin ti, este día nunca habría llegado.

## Índice

<i>Resumen</i>	1
<i>Summary</i>	3
<b>1. Introducción General.</b>	<b>5</b>
1.1. Importancia de la congelación espermática en el tratamiento de la infertilidad humana.	6
1.2. Antecedentes históricos de la criopreservación de espermatozoides humanos.	8
1.3. Usos clínicos de los espermatozoides congelados.	13
1.4. Alteraciones en la célula espermática asociados al proceso de criopreservación.	15
1.5. Factores que afectan al resultado de la congelación.	17
1.5.1. Medios de congelación.	17
1.5.2. Composición de la membrana plasmática.	19
1.5.3. Estrés oxidativo y congelación.	21
1.5.4. Descongelación.	23
<b>2. Presentación de los trabajos.</b>	<b>25</b>
2.1. Objetivos generales y específicos.	28
2.2. Resumen global de los resultados.	29
2.3. Conclusiones finales.	35
<b>3. Referencias.</b>	<b>36</b>
<b>4. Anexos.</b>	<b>55</b>
I.    Abreviaturas	56
II.   Copia de trabajos publicados	59

## **Resumen**

Los avances producidos en las técnicas de reproducción asistida unidos a la posibilidad de preservar la funcionalidad espermática han llevado a que la congelación de espermatozoides sea una opción terapéutica comúnmente utilizada en la clínica reproductiva. Sin embargo, pese a las mejoras logradas en los protocolos de congelación-descongelación, los resultados hasta ahora obtenidos en términos de calidad espermática tras la descongelación no son del todo ni en todos los casos satisfactorios.

Diversos estudios cifran la disminución provocada en la viabilidad espermática tras el proceso de congelación-descongelación en valores próximos al 50%, siendo estas cifras incluso mayores en aquellos varones que presentan problemas de infertilidad. Por otra parte, la gran variabilidad entre individuos y la ausencia de marcadores biológicos fiables que permitan predecir qué tipo de muestras seminales son más resistentes a la criopreservación, hacen necesario el desarrollo de nuevas investigaciones con objeto de optimizar los resultados del proceso.

En la presente tesis doctoral se aborda el estudio de diversos factores que influyen en el resultado de proceso de congelación-descongelación de espermatozoides. Por un lado, estudiamos factores que no dependen directamente de las características propias de la muestra, es decir, son factores extrínsecos. Los factores estudiados en la presente tesis doctoral son el protocolo de descongelación (estudio 1) y la adición de sustancias antioxidantes a los medios (estudio 2). En el tercer estudio que completa esta tesis hemos analizado una serie de factores que podemos clasificar de intrínsecos de la muestra, como son la composición en ácidos grasos o la capacidad antioxidante del plasma seminal y que determinan en parte el éxito de la congelación.

En el primer estudio analizamos si la modificación en el protocolo de descongelación habitualmente empleado resultaba en una mejora en los parámetros espermáticos. Para ello evaluamos un protocolo en el que se produce una rápida dilución de la muestra congelada así como un aumento en la velocidad de descongelación.

Al descongelar las muestras seminales mediante inmersión en medio a 37°C observamos una mejora estadísticamente significativa en determinados parámetros cinéticos como el porcentaje de espermatozoides con movilidad rápida y progresiva, así como se detecta una menor proporción de espermatozoides con alteración en el acrosoma y una menor condensación en su cromatina. Igualmente, con este método de descongelación se detecta un incremento en el porcentaje de espermatozoides viables que presentaban un bajo desorden lipídico.

En el segundo trabajo se evaluaron los efectos que provocó en los espermatozoides descongelados, la adición de genisteína al medio de congelación y al de descongelación. La genisteína es una isoflavona que presenta propiedades antioxidantes a la vez que inhibitorias de la protein tirosin quinasa. Del estudio realizado podemos destacar que esta sustancia (10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) tiene efectos antioxidantes que limitan o contrarrestan la generación de agentes reactivos de



oxígeno (ROS). Por lo que la adición de esta sustancia va a originar una ligera mejora en la motilidad espermática así como una reducción en la fragmentación del ADN. Por otra parte se observa un menor desorden lipídico en los espermatozoides descongelados mediante la adición de esta sustancia.

En el tercer trabajo estudiamos la posible relación existente entre la composición de los ácidos grasos de los espermatozoides y del plasma seminal con la calidad espermática de la muestra, tanto antes como después de la congelación-descongelación. La influencia de la capacidad antioxidante total del plasma seminal en el proceso también fue analizada.

Encontramos que la composición de los ácidos grasos en la membrana de los espermatozoides está estrechamente relacionada con la calidad seminal tanto antes como tras la congelación-descongelación. Observando una correlación positiva entre ácidos grasos Poliinsaturados (PUFAs), en especial los ácidos omega 3, con la motilidad y viabilidad de los espermatozoides. De igual manera encontramos una relación entre la composición de ácido docosahexanoico (DHA) y de ácido esteárico (C18:0) en plasma seminal con la motilidad de los espermatozoides antes y después de congelar. La capacidad antioxidante total (TAC) en plasma seminal se relaciona directamente con las concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). También observamos una estrecha relación de este parámetro con la motilidad de la muestra descongelada.

Conocer la composición de ácidos grasos de la muestra a congelar nos puede ayudar a predecir el comportamiento de dicha muestra al proceso de criopreservación, así como para establecer estrategias encaminadas a modificar la composición lipídica y capacidad antioxidante de las muestras que favorezcan los resultados de la congelación.

Como en todas las ramas de la ciencia, los avances en el campo de la criobiología no suelen ser espectaculares, se necesitan pequeñas, pero continuas mejoras para ir logrando un avance significativo en la optimización del proceso. Con estos trabajos hemos demostrado que la modificación de ciertos factores extrínsecos ocasiona mejoras estadísticamente significativas en la congelación – descongelación de espermatozoides. A la vez hemos puesto de manifiesto la existencia de factores intrínsecos de la muestra que determinan el resultado de la criopreservación. Como complemento de los estudios realizados en la presente tesis doctoral en el futuro se deberían realizar estudios clínicos aleatorizados y controlados, con la finalidad de comprobar si estas modificaciones en los protocolos además de significación estadística presentan significación clínica, medida en términos de mejora de los resultados reproductivos tras su empleo en tratamientos de inseminación artificial y/o fecundación in vitro. Otro aspecto interesante a desarrollar sería la modificación de los perfiles lipídicos de los espermatozoides mediante terapias nutricionales y su repercusión en la criotolerancia de la muestra.

## Summary

The advances in assisted reproductive techniques and the ability to freeze human spermatozoa have led that sperm cryopreservation is a commonly used treatment option in the reproductive clinic. However, despite improvements in the freeze-thawing protocol results in terms of sperm quality after thawing not been entirely satisfactory. Several studies suggest that the decrease in sperm viability after freezing-thawing process is about to 50%, and these figures are even higher in those men with infertility problems. Moreover, the large variability between individuals and the lack biomarkers to predict what type of semen samples is more resistant to cryopreservation require the development of new research in order to optimize the results of the process. In the current study, we have analyzed several factors and its influence the result of freeze-thawing spermatozoa. We study factors that are not directly dependent on the characteristics of the sample, extrinsic factors. These factors studied are thawing protocol (study 1) and the addition of antioxidants to the media (study 2). In the third study we have analyzed intrinsic factors to the sample, such as fatty acid composition and antioxidant capacity of seminal plasma that could predict the success of the freeze.

In the first study, we evaluated the effects of a novel thawing methodology on sperm function after cryopreservation versus traditional protocols. Pellets were immersed directly in thawing medium at 37°C for 20 minutes versus 10 minutes in air at room temperature and subsequently 10 minutes at 37°C. This procedure leads to a higher rate of temperature increase and a dilution of the glycerol present in the freezing medium. Sperm thawing with this alternative method present higher viability, an improved in motility parameter and less acrosome damage. We also detected an increase in the percentage of viable spermatozoa with low membrane lipid disorder and a reduction in chromatin condensation.

In the second study, we evaluated the effects of genistein supplementation in freezing and thawing extender on frozen and thawed human semen parameters. Genistein is an isoflavone with antioxidant properties and inhibits protein tyrosine Kinases. We have confirmed that the isoflavone genistein (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) has antioxidant effects and decrease the membrane lipid disorder and DNA damage caused by cryopreservation. Reduction in ROS production as well as a slight improvement in motility parameters is other effects caused by the use of this isoflavone.

In the third study, we analyzed the relationships between the fatty acid composition of human spermatozoa or seminal fluid before freezing and sperm quality, measured in terms of viability and motility, before and after freezing-thawing. The influence of the total antioxidant capacity (TAC) of seminal plasma in the process was also analyzed.

We found a significantly positively correlated between polyunsaturated fatty acids (PUFAs),  $\omega 3$  PUFAs in special Docosahexaenoic acid (DHA) in sperm with sperm viability and motility parameters before and after freezing.

Motility parameters before and after freezing were related to stearic acid (C18:0) and DHA in seminal plasma. Total antioxidant capacity in seminal plasma was directly related to PUFAs and motion parameters after thawing. Fatty acids compositions could be used as predictor of the capacity of cryopreservation. On the other hand, we could design further procedures to modify the lipid composition or/and antioxidant capacity of ejaculate to make it more resistant to the cryopreservation.

As in all fields of science, advances in cryobiology are not usually spectacular; we need small but continuous improvements for process optimization. In this doctoral thesis we have found that modification of extrinsic factors could improve sperm functionality in cryopreservation process. Also, we have shown that intrinsic factors could be able to predict the outcome of cryopreservation. New studies should be included randomized and controlled trials, in order to test whether these changes in addition to statistical significance have clinical significance. Another interesting study is for modifying lipid profiles of sperm by nutritional therapies and the measurement of their impact on the cold tolerance of the sample.

## **1. Introducción General**

### **1.1. Importancia de la congelación espermática en el tratamiento de la infertilidad humana.**

En la actualidad se estima que aproximadamente entre el 17 y el 25% de las parejas en edad reproductiva presentan problemas de infertilidad (De Kretser, 1997; Dunson et al., 2004; Ledger, 2009). Esta situación supone que entre 70 y 80 millones de personas en todo el mundo presentan alguna patología que les impide tener descendencia y que para conseguir la gestación deseada necesitan del uso de técnicas de reproducción asistida (Boivin et al., 2007; Ombélet et al., 2008). En aproximadamente el 50% de las parejas se puede apreciar que la causa de este problema de infertilidad está asociado a un factor masculino bien de forma aislada o en combinación con un factor femenino (Rowe y Comhaire, 2000). Por otra parte, en los últimos años se ha detectado a nivel mundial la disminución de la calidad seminal de la población humana que estaría provocando un aumento en la prevalencia de la sub-fertilidad masculina (Carlsen et al., 1992; Irvine et al., 1996; Jouannet et al., 2001; López Teijón et al., 2007; Merzenich et al., 2010; Jorgensen et al., 2012). Distintos factores podrían explicar la disminución de la calidad seminal como son los problemas nutricionales (Wong et al., 2000), los altos niveles de estrés emocional (Seibel y Taymor, 1982; McGrady, 1984), el consumo de tabaco, alcohol y drogas ilegales (Saleh et al., 2002; Pasqualotto et al., 2004) o los factores medioambientales (Sinclair, 2000; Oliva et al., 2001; Sharpe y Irvine, 2004).

El aumento en la prevalencia de la sub-fertilidad e infertilidad masculina, unido a cambios sociales en relación a la reproducción, como son el retraso en la edad de la mujer a la hora de buscar un embarazo o el aumento del número de mujeres sin pareja masculina con deseo maternal, ha provocado un incremento en el número de tratamientos de reproducción asistida (de Mouzon et al., 2012). En muchos de estos tratamientos se utilizan muestras de semen congelado, que en numerosas ocasiones proceden de donantes de semen, mientras que en otras ocasiones proceden del propio paciente (Mortimer, 2004). En los últimos años se ha ido incrementado el número de inseminaciones intrauterinas realizadas utilizando muestras seminales congeladas de donantes (IAD). Según los datos que ofrece la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) en el conjunto de los países europeos, éstas han pasado de aproximadamente 14.000 inseminaciones en el año 2001 (Nygren, 2005) a realizar algo más 26.000 en el año 2007 (de Mouzon et al., 2012). A estas cifras deberíamos añadir los tratamientos de reproducción asistida diferentes de la inseminación intrauterina (IAD) en los cuales se utilizan espermatozoides congelados y de los que no existen registros oficiales. Según los datos recopilados por las clínicas del grupo *Instituto Valenciano de Infertilidad* durante el

periodo comprendido entre 1998 a 2009, se habrían utilizado muestras seminales congeladas en un tercio del total de las inseminaciones intrauterinas realizadas y en aproximadamente el 7% de los ciclos de fecundación *in vitro* y/o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Garrido et al., 2010).

Todos estos datos tomados en su conjunto ponen en evidencia la gran importancia que la criopreservación espermática tiene hoy en día en el campo de la reproducción asistida humana.

## **1.2. Antecedentes históricos de la criopreservación de espermatozoides humanos.**

Los primeras referencias sobre la congelación de espermatozoides de animales se remontan a la segunda mitad del siglo XVIII, cuando Spallanzani observa que la motilidad espermática decrece como consecuencia de la reducción de la temperatura que se produce al mantener la muestra seminal en la nieve (Spallanzani, 1776). Ya desde el inicio de estos primeros estudios se vieron claras las aplicaciones prácticas que el desarrollo de esta técnica podría conllevar. Así, en 1866 Paolo Montegazza, tras observar la supervivencia de espermatozoides congelados a  $-15^{\circ}\text{C}$ , fue el primer investigador en sugerir la creación de bancos de semen con objeto de preservar la fertilidad de los soldados que acudían a las contiendas (Montegazza, 1886).

En la primera mitad del siglo XX se realizaron numerosas investigaciones con objeto de conocer la fisiología de los espermatozoides en condiciones de baja temperatura (Shettles, 1940). Esto permitió mejorar los métodos iniciales de criopreservación de espermatozoides mediante la utilización de nuevos medios basados en yema de huevo (Salisbury et al., 1941) o la aplicación de nuevos métodos para recuperar el mayor número de espermatozoides viables (Hoagland and Pincus, 1942). Pero, sin duda, el mayor avance producido en esta época en la criobiología del espermatozoide fue conseguido con el descubrimiento del glicerol como crioprotector (Polge et al., 1949). La aplicación de este crioprotector permitiría mejorar la calidad de las muestras descongeladas al disminuir la concentración de agua intracelular y minimizar el efecto deletéreo producido por la formación de cristales durante la congelación (Mazur, 1970).

A partir de este punto y debido al creciente interés en las posibilidades de la criopreservación espermática se sucedieron de manera continuada los estudios que culminan en 1951 con el nacimiento del primer ternero resultante de la aplicación de semen congelado (Polge y Rowson, 1952). Poco después se consigue el primer embarazo humano tras realizar una

inseminación con espermatozoides congelados en hielo seco a  $-78^{\circ}\text{C}$  (Bunge y Sherman, 1953) y continúa con otras especies de animales domésticos como los equinos y porcinos (revisado por Curry, 2000).

El uso de los vapores de nitrógeno para facilitar el proceso de congelación (Sherman, 1963) y la posibilidad de almacenar las muestras congeladas en nitrógeno líquido a temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$  permitieron el rápido desarrollo de esta técnica y ampliar las aplicaciones clínicas (Perloff et al., 1964). A principios de los años 70, los continuos avances en los métodos de congelación llevaron a la creación de los primeros bancos de semen con un carácter eminentemente comercial (Mortimer, 2004). Pero la proliferación y establecimiento de una red de bancos de semen no se produjo realmente hasta mediados de los años 80 cuando se estableció la necesidad de congelar las muestras seminales de los donantes con objeto de poder diagnosticar, y descartar en su caso, las infecciones de enfermedades de transmisión sexual como el virus de inmunodeficiencia adquirida (virus HIV) (Englert et al., 2001; Agboghoroma y Giwa-Osagie, 2012).

En la década de los 80 se realizaron estudios básicos sobre los procesos físico-químicos que se producen en la congelación de diferentes células animales y que determinan la alteración de las misma (Mazur, 1984; Leibo, 1986). Durante esta época se analizaron y optimizaron los factores que pueden determinar el éxito de la congelación, entre los que se encuentran las curvas de congelación y descongelación (Henry et al., 1993; Verheyen et al., 1993) o la concentración de glicerol (Critser et al., 1988; Alvarez and Storey, 1993; Gao et al., 1993). Estos estudios fueron la base de la mejora sustancial que se produjo en los sistemas de congelación.

En cuanto a los protocolos de congelación se refiere, el sistema de congelación en píldoras o pellet fue desarrollado en primer lugar en animales domésticos, concretamente fue aplicado inicialmente para congelar espermatozoides de toro (Nagase and Niwa, 1964), para ser posteriormente utilizado en humanos (Glander y Luppá, 1979; Jeyendran et al., 1984; Weidel y Prins, 1987). Pese a que pueda ser considerado por algunos autores un protocolo en desuso, es una alternativa vigente a día de hoy (Kaneko et al., 1990; Garrido et al., 2002b; Meseguer et al., 2004) que presenta evidentes ventajas a la hora de optimizar la utilización de muestras valiosas, como son las procedentes de aspirado de epidídimo, de biopsia de testículo o de pacientes oncológicos (Gil Salom et al., 1996). En estudios desarrollados con espermatozoides tanto de animales domésticos como de humanos se observó que los espermatozoides congelados en pellet o píldoras presentaban una mayor motilidad tras la descongelación que los espermatozoides

congelados en pajuelas y expuestos a vapores de nitrógeno (Maxwell et al., 1995; Garrido et al., 2002b). Esta ventaja podría estar basada en que el pequeño volumen de la muestra y el contacto directo con el hielo seco favorece la transmisión rápida de temperatura, favoreciendo la velocidad tanto de congelación como de descongelación. Sin embargo, otros autores al realizar estudios comparativos no encuentran diferencias en los parámetros de motilidad, en el test de penetración de mucus cervical (Weidel y Prins, 1987) ni en el nivel de acrosina (Jeyendran et al., 1984). Estos datos tomados en su conjunto podrían sugerir que otros factores que afectan a la congelación, como el medio utilizado, son más decisivos en los resultados de la congelación que el procedimiento empleado.

A lo largo del tiempo se han utilizado diversos tipos de envase en la criopreservación de espermatozoides. Así, se ha pasado de utilizar los iniciales envases o ampollas de cristal, con el peligro de rotura que ello conllevaba, a utilizar criotubos de polipropileno (PP) o pajuelas de politereftalato de etileno (PTEG) que facilitan la manipulación y almacenaje de las muestras congeladas (revisado por Mortimer, 2004). En los últimos años se han desarrollado pajuelas termosellables fabricadas con resinas ianoméricas, capaces de dotar al envase de una alta seguridad (Mortimer, 2004; Bielanski y Vajta, 2009), minimizando así el bajo riesgo de contaminación cruzada entre muestras seminales congeladas (Clarke, 1999; Bielanski y Vajta, 2009).

La congelación en pajuelas o criotubos por el método lento fue propuesta inicialmente por (Behrman y Sawada, 1966) y conlleva una disminución progresiva de la temperatura de la suspensión de espermatozoides antes de realizar la congelación. El procedimiento consiste en añadir, lentamente y en continua agitación, el crioprotector a la muestra seminal a congelar. Seguidamente se reduce de forma progresiva la temperatura de la suspensión hasta 5°C, para posteriormente realizar la congelación de la muestra de forma lenta hasta alcanzar la temperatura de -80°C, para terminar con el almacenaje en nitrógeno líquido a -196°C. Los índices óptimos de disminución de la temperatura desde la temperatura ambiente hasta los 5°C son 0.5-1°C/min (Mahadevan y Trounson, 1984) y los de congelación (de 5 a -80°C) de 1-10°C/min (Thachil y Jewett, 1981). Debido a los problemas de reproductibilidad que este procedimiento manual puede presentar, se desarrollaron congeladores programables que mediante un sofisticado software controlan con precisión las curvas de temperatura deseadas (Holt, 2000). Por el contrario, la técnica de congelación rápida requiere el contacto directo de la muestra a congelar con vapores de nitrógeno durante un corto periodo de tiempo (10-30 minutos). Esta situación induce una reducción muy rápida de la temperatura antes de ser sumergidos en



nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Sherman, 1990). En estos protocolos de congelación rápida, la temperatura lograda por la exposición a los vapores de nitrógeno varía en función de la distancia de la muestra a la superficie del nitrógeno así como del volumen de nitrógeno utilizado.

Distintos autores han realizado comparaciones entre los protocolos de congelación lenta y rápida obteniendo resultados contradictorios (Thachil y Jewett, 1981; Serafini y Marrs, 1986; Ragni et al., 1990; Verheyen et al., 1993; Hammadeh et al., 2001). En cualquier caso, y como norma general, se puede afirmar que una rápida congelación, con índices de enfriamiento supraóptimos, tiende a causar procesos de lisis celular debido a fenómenos de formación de cristales intracelulares; mientras que en un protocolo de congelación lento se puede disminuir la formación de cristales, pero por el contrario se incrementa el choque osmótico con el consiguiente efecto dañino para el espermatozoide (Mazur, 1984).

Por otra parte, las indicaciones y aplicaciones de la congelación de espermatozoides en los tratamientos de reproducción asistida se han incrementado notablemente en los últimos años (de Mouzon et al., 2012). En concreto, se produjo un gran salto cualitativo con la puesta en marcha de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Palermo et al., 1992). Esta técnica permite que espermatozoides viables, tanto móviles como inmóviles puedan ser utilizados para fecundar un ovocito. Por tanto, se puede aplicar en varones que presentan una oligozoospermia severa o a permite la utilización de espermatozoides obtenidos de testículo o epidídimo (Gerris et al., 1995; Baker, 2000).

La aplicación de la técnica ICSI abrió nuevas expectativas en los tratamientos realizados con muestras congeladas. Así pocos años después de la utilización generalizada del ICSI se conoció el nacimiento de niños como resultado de la utilización de muestras congeladas procedentes de epidídimo (Devroey et al., 1995), de testículo (Gil Salom et al., 1996) o de espermatozoides de varones que habían preservado su fertilidad por un proceso oncológico (Chen et al., 1996). Otra de las posibilidades, no exenta de polémicas éticas y legales, que se derivan de la utilización conjunta de ambas técnicas (espermatozoides congelados e ICSI), es el nacimiento de niños a partir de espermatozoides de varones fallecidos que previamente habían congelado sus espermatozoides (Ahuja et al., 1997).

Otros procedimientos de congelación espermática están en fase experimental y están siendo evaluados actualmente. Entre estos procedimientos podemos destacar la vitrificación espermática, que fue planteada inicialmente en los años 30-40 (Luyet y Hodapp, 1938; Hoagland y

Pincus, 1942) y ha vuelto a ser reevaluada como método para conservar espermatozoides debido al éxito obtenido en la vitrificación de ovocitos y embriones (Isachenko et al., 2004; Isachenko et al., 2005; Morris, 2006; Endo et al., 2012b).

En el protocolo de vitrificación espermática se aplican velocidades de enfriamiento muy elevadas ( $5 \times 10^3$  °C/min), con medios que presentan altas concentraciones de crioprotector (3.5-8M) y se utilizan pequeños volúmenes de muestra. Con todo ello se consigue minimizar la formación de cristales intracelulares y por tanto disminuir el daño celular producido durante la congelación. Por el contrario, las altas concentraciones de crioprotectores ejercen un efecto perjudicial sobre los espermatozoides. Para evitar estos problemas, en los últimos años se han desarrollado protocolos de vitrificación sin crioprotector (Isachenko et al., 2004) o con sustancias no permeables como glucosa, sucrosa y trehalosa con prometedores resultados (Isachenko et al., 2008). Estos avances en la vitrificación espermática han llevado a que recientemente se haya descrito el nacimiento de niños como resultado de la aplicación de la inyección intracitoplasmática a partir de espermatozoides criopreservados mediante vitrificación (Endo et al., 2012a).

Otra técnica de preservación espermática actualmente en estudio es la liofilización de espermatozoides que permite la eliminación de la mayor parte del agua de la célula por sublimación. La principal ventaja que ofrece es la facilidad de almacenaje y transporte de las muestras. Los investigadores del grupo del Dr. Riuzo Yanagimachi describieron por primera vez el nacimiento de ratones tras el empleo de espermatozoides de ratón liofilizados e inyectados en ovocitos mediante ICSI (Wakayama y Yanagimachi, 1998). Posteriormente se describe el nacimiento de animales en otras especies como la rata, hámster o conejo (Liu et al., 2004), mientras que en otros mamíferos como el toro, el cerdo o el mono se han producido embriones en diversas fases de desarrollo (Keskintepe et al., 2002; Kwon et al., 2004), ya que el proceso altera la estructura de los microtúbulos y disminuye la capacidad del espermatozoide para activar el ovocito (Hochi et al., 2011).

Los primeros estudios *in vitro* realizados en la especie humana ponen de manifiesto que la liofilización daña severamente las membranas espermáticas del espermatozoide, pero preserva adecuadamente la integridad de los cromosomas y del ADN (Kusakabe et al., 2008; Gianaroli et al., 2012).

Otra situación especial se presenta cuando las muestras muestran presentan un bajo número de células viables, como por ejemplo las muestras oligozoospermicas o astenozoospermicas severas, muestras criptozoospermicas, o bien en muestras de espermatozoides procedentes de aspirados de epidídimo o biopsia de testículo. En estos casos, se han usado diferentes sistemas para guardar y congelar un número reducido de espermatozoides. Entre ellos se incluye el uso de zonas pelúcidas de diferentes especies, así como de cryoloops, pajuelas, o microesferas de gel de agarosa (revisado por (AbdelHafez et al., 2009). Los resultados obtenidos varían entre el 59 y el 100% en la tasa de recuperación espermática y entre un 18 y un 67% en la tasa de fecundación (revisado por (AbdelHafez et al., 2009).

### **1.3. Usos clínicos de los espermatozoides congelados.**

El objetivo primordial de la criopreservación de espermatozoides es mantener la viabilidad y funcionalidad de los mismos a bajas temperaturas (-196°C) durante largos periodos de tiempo hasta su posible utilización en tratamientos de reproducción asistida. Los usos clínicos de la congelación espermática han ido variando con el tiempo, a la par que los avances en las técnicas de reproducción asistida o los cambios sociales relacionados con la reproducción (revisado por Anger et al., 2003; Mortimer, 2004). Entre las aplicaciones actuales del semen congelado deberíamos distinguir primeramente entre aquellas asociadas a la preservación del semen del propio paciente de las aplicaciones del semen para donación (Mortimer, 2004).

#### ***Muestras congeladas de pacientes***

Entre las aplicaciones en la congelación del semen de pacientes destacamos su empleo en varones que van a someterse a un tratamiento médico o quirúrgico que puede alterar la capacidad reproductiva del paciente. La congelación espermática es una manera de asegurar la posibilidad de poder usar espermatozoides de calidad suficiente en un tratamiento de reproducción asistida. Entre las situaciones más frecuentes podemos encontrar la esterilización quirúrgica (vasectomía) (Wood et al., 2002); pacientes que sufren enfermedades sistémicas que pueden afectar a su fertilidad como son las enfermedades autoinmunes o la diabetes (Ranganathan et al., 2002); varones que van a ser expuestos a agentes tóxicos o tratamientos médicos que puedan afectar a la espermatogénesis (Anger et al., 2003). Por otra parte, los avances obtenidos en el campo de la oncología han logrado aumentar la esperanza de vida e incluso la curación de una gran parte de los pacientes oncológicos (Sant et al., 2007; Sharma, 2011). Sin embargo, este éxito terapéutico conlleva la aplicación de tratamientos agresivos,

especialmente quimioterapia y radioterapia, que presentan un marcado efecto gonadotóxico y que tiene como consecuencia que entre un 15 a un 30% de los varones sometidos a estos tratamientos quedan estériles (Schrader et al., 2001; Williams, 2010). En este tipo de pacientes, siguiendo las recomendaciones de las sociedades científicas (Lee et al., 2006), se procede a la congelación de espermatozoides antes de iniciar el tratamiento oncológico, para su potencial uso posterior (Meseguer et al., 2006; Hourvitz et al., 2008).

Otro tipo de pacientes que hacen uso de la criopreservación son aquellos que presentan dificultades de eyaculación, en pacientes que deben ser sometidos a biopsias de testículo o aspirado de epidídimo (Di Santo et al., 2012) y en pacientes que padecen aneyaculación producida por lesión medular (da Silva et al., 2010). Con el uso de semen criopreservado aseguramos la disponibilidad de espermatozoides viables en el momento de la aplicación de la técnica de reproducción asistida y se reduce el número de intervenciones sobre el paciente algunas de ellas de marcado carácter invasivo.

#### ***Muestras de donantes de semen***

Las muestras seminales de donantes deben ser criopreservadas antes de su utilización en los tratamientos de reproducción asistida (Agboghoroma y Giwa-Osagie, 2012). Con ello se consiguen dos objetivos fundamentales, por un lado se pueden realizar las determinaciones tanto microbiológicas como serológicas necesarias para confirmar la seguridad biológica de las muestras (Morris et al., 1999) y por otro lado, nos permite disponer de un amplio abanico de donantes con distinto fenotipo y genotipo en el momento de su utilización en una técnica de reproducción asistida.

#### ***Rendimiento reproductivo resultante de la aplicación del semen congelado***

La gran variedad de aplicaciones clínicas de la criopreservación espermática ha supuesto que sea una técnica de rutina en los laboratorios de Andrología de las unidades de Reproducción Humana. Sin embargo, y a pesar de los importantes logros alcanzados, el proceso de congelación-descongelación ocasiona un importante daño celular ampliamente estudiado por distintos autores (Centola et al., 1990; Henry et al., 1993; Watson, 1995; O'Connell et al., 2002; Ozkavukcu et al., 2008) que tiene su repercusión en los rendimientos reproductivos.

Es bien conocido desde el inicio de la aplicación de la congelación que la tasa de gestación de la inseminación intrauterina (IUI) con semen congelado es inferior a la que se obtiene con semen fresco (Sherman, 1973). En un estudio donde se analizaba la eficacia de un sistema de inseminación con semen de donante fresco frente a semen congelado, se determinó que la probabilidad de producirse la gestación era tres veces mayor con semen fresco que con semen congelado (Richter et al., 1984). Sin embargo, diversos autores han descrito resultados similares en rendimiento reproductivo al usar ICSI con semen fresco y congelado (Kuczyński et al., 2001) o al menos al usar muestras normozoospermicas en estos sistemas ICSI (Borges et al., 2007). Resultados similares se obtienen al utilizar la ICSI con espermatozoides del epidídimo recién obtenidos o congelados (Van Steirteghem et al., 1998; Tournaye et al., 1999).

#### **1.4. Alteraciones en la célula espermática asociados al proceso de criopreservación.**

Durante el proceso de congelación y descongelación los espermatozoides están sujetos a una serie de cambios drásticos que van a originar un estrés físico-químico con importantes repercusiones tanto en la viabilidad como en la funcionalidad espermática (revisado por (Benson et al.; Di Santo et al., 2012; Morris et al., 2012). La consecuencia de este proceso es que alrededor de un 50% de los espermatozoides se dañan durante los protocolos de congelación-descongelación (Watson, 1979; Nijs y Ombelet, 2001).

Los mecanismos que ocasionan las alteraciones en el espermatozoide humano parecen ser multifactoriales (Royere et al., 1996; Oehninger et al., 2000). Inicialmente se describieron los daños producidos por las alteraciones físico-químicas que se producen en la célula espermática durante el proceso de congelación y descongelación (Mazur, 1984; Leibo et al., 2002). Así, se desarrolló la teoría de los “dos factores”, según la cual el daño producido en la criopreservación puede ser explicado por dos fenómenos opuestos (Mazur, 1970). Por un lado, se produce la alteración de la estructura de la membrana espermática debido a la formación de cristales intracelulares originados mayoritariamente por un rápido enfriamiento; y por otro lado, se produce una alteración de la célula asociado al efecto osmótico, que se hace más evidente en los protocolos de congelación que utilizan bajos índices de enfriamiento (Mazur, 1977).

Tanto en la congelación como en el proceso de descongelación se produce un **choque osmótico**, por una parte asociado a la adición de agentes crioprotectores y por otra por la coexistencia durante la congelación de una fase líquida y una fase sólida que provoca que la célula se encuentre en un medio hipertónico, con la consiguiente salida de agua intracitoplasmática.

Durante la descongelación ocurre el fenómeno contrario, el agua en estado sólido pasa a estado líquido y se establece un medio hiposmótico con la entrada de agua al interior del espermatozoide y la consiguiente rehidratación del mismo (Holt, 2000).

Los protocolos de congelación con un bajo índice de enfriamiento provocarían el llamado “efecto soluto” que consiste en un daño celular ocasionado por la modificación del pH, el incremento de la presión osmótica y por la precipitación de proteínas al deshidratarse la célula excesivamente. Por ello, los protocolos de congelación óptimos serían aquellos en los que la velocidad de enfriamiento sea lo suficientemente lenta para provocar la deshidratación, minimizando así la formación de cristales y lo suficientemente rápida para evitar el efecto soluto (Gao et al., 1997). Aunque la teoría de los dos factores está ampliamente aceptada, la aplicación de protocolos de vitrificación en los que se evita la formación de cristales intracelulares, ha puesto de manifiesto que el daño celular está principalmente asociado al efecto osmótico (Morris, 2006).

Otro mecanismo que afecta a la viabilidad del espermatozoide está relacionado con el **choque térmico**, producido por el cambio brusco de temperatura que produce un cambio de fase en los lípidos de membrana (Drobnis et al., 1993) y puede ocurrir tanto en el proceso de congelación como en el de calentamiento de la muestra (Holt y North, 1991). Con objeto de minimizar este choque térmico se han propuestos procedimientos en los cuales el crioprotector se añade en frío (4°C) obteniéndose mejoras en la motilidad y velocidad de los espermatozoides tras la descongelación así como en la capacidad fecundante (Clarke et al., 2004).

Durante el proceso de congelación-descongelación se produce un **estrés oxidativo** que tiene un marcado efecto deletéreo en los espermatozoides (Alvarez y Storey, 1992; Wang et al., 1997), debido por una parte a la generación de radicales libres de oxígeno (ROS) (Wang et al., 1997) y por otra por la alteración del sistema antioxidante del espermatozoide (Lasso et al., 1994; Gadea et al., 2011). Este fenómeno oxidativo ocasiona la peroxidación de los lípidos de membrana (Alvarez y Storey, 1992), alteraciones de las proteínas y fragmentación de ADN (Hamamah et al., 1990; Donnelly et al., 2001).

Los procesos anteriormente descritos, que se producen durante la congelación/descongelación pueden causar en la célula efectos deletéreos de diversa índole como son la alteración de la estructura de la membrana plasmática y acrosomal (Centola et al., 1990; Cross y Hanks, 1991; Henry et al., 1993; McLaughlin et al., 1993), así como alteraciones en la

morfología del espermatozoide (O'Connell et al., 2002; Ozkavukcu et al., 2008). Todos estos cambios llevan asociados una disminución en la viabilidad y motilidad espermática (Keel y Karow, 1980; Critser et al., 1988), así como fenómenos de hiper-condensación de la cromatina (Royere et al., 1988).

Por otra parte se ha descrito que la congelación de los espermatozoides activa los sistemas de apoptosis lo que lleva aparejado la alteración de los lípidos de membrana con la externalización de la fosfatidil serina desde la capa interna a la superficie de la membrana (Glander y Schaller, 1999), la activación de caspasas (Paasch et al., 2004; Wünderlich et al., 2006) y la fragmentación del ADN (Thomson et al., 2009).

Otro de los efectos asociados a la congelación es la alteración de proteínas del espermatozoides que tienen un rol importante en la funcionalidad de estas células, como es el caso de la proteína fosfolipasa C zeta (Kashir et al., 2011) que participa en el proceso de activación ovocitaria (Parrington et al., 2007) o como la proteína P34H (Desrosiers et al., 2006) implicada en la unión espermatozoide-zona pelúcida (ZP) (Boue et al., 1994).

### **1.5. Factores que afectan al resultado de la congelación.**

El éxito del proceso de criopreservación está relacionado con múltiples factores. Entre ellos podemos hacer una clara distinción entre los factores que están asociados a la técnica de la congelación (factores extrínsecos), de aquellos factores que están asociados con las propiedades intrínsecas o características de los espermatozoides de cada paciente.

Entre los factores extrínsecos podríamos incluir entre otros el tipo de crioprotector utilizado (Stanic et al., 2000; McGonagle et al., 2002), la temperatura de adición del crioprotector a la muestra seminal (McGonagle et al., 2002; Clarke et al., 2004), el método de congelación (Stanic et al., 2000; McGonagle et al., 2002; Nallella et al., 2004), el volumen de muestra congelado, el sistema de envasado (Mortimer, 2004), los protocolos de descongelación (McGonagle et al., 2002; Calamera et al., 2010) o bien el uso de sustancias antioxidantes (Askari et al., 1994; Rossi et al., 2001; Garcez et al., 2010; Li et al., 2010; Martínez-Soto et al., 2010; Gadea et al., 2011).

Entre los factores intrínsecos se incluirían aquellos que determinan las características genéticas y estructurales de los espermatozoides, así como la calidad seminal de la muestra a

congelar. Entre ellas podríamos destacar las características espermáticas como la fluidez de la membrana plasmática (Giraud MN et al., 2000), la composición lipídica (Swain y Miller Jr, 2000; Miller et al., 2005; Waterhouse et al., 2006; Martínez-Soto et al., 2012), las diferencias genéticas entre individuos (Thurston et al., 2002) o bien diferencias en el sistema antioxidante (Meseguer et al., 2004) que pueden condicionar el éxito de la criopreservación.

La influencia de los parámetros seminales clásicos de concentración, motilidad y morfología en el éxito de la congelación espermática ha sido también objeto de estudio y discusión, mientras algunos autores consideran que la calidad seminal inicial está estrechamente relacionada con el éxito del proceso (Harrison y Sheppard, 1980; Keel y Karow, 1980; Freour et al., 2009), mientras que otros investigadores no encuentran esa relación (Behrman y Sawada, 1966; Amelar y Dubin, 1980).

#### **1.5.1. Medios de congelación**

El uso generalizado de los agentes crioprotectores ha sido uno de los mayores avances producidos hasta la fecha en los protocolos de criopreservación espermática. El glicerol, en concentraciones finales del 6 al 7,5% (v/v), es el agente crioprotector por excelencia (Gao et al 1992). Pertenece junto a sustancias como, el dimetilsulfoxido (DMSO), propilen glicol y etilen glicol o el propanodiol (PROH) al grupo de los crioprotectores permeables caracterizados por ser sustancias de bajo peso molecular y que son permeables a través de la membrana (Gilmore et al 1997). Estos crioprotectores pueden utilizarse junto con sustancias no permeables como Sucrosa o Trehalosa que ocasionan un incremento en la osmolaridad extracelular y favorecen la deshidratación durante el proceso de congelación. Sin embargo, en la congelación de espermatozoides humanos, el componente no permeable comúnmente utilizado es la yema de huevo. La yema de huevo, además de incrementar la osmolaridad extracelular, presenta la propiedad de mantener la fluidez de la membrana plasmática debido a las interacciones de la membrana del espermatozoide con los lípidos de baja densidad (Gamzu et al., 1997). Aunque el uso de los agentes crioprotectores, como el glicerol, es indispensables hoy día para obtener unos resultados aceptables en el proceso de criopreservación, su utilización no está exenta de efectos tóxicos para el espermatozoide, principalmente debidos al estrés osmótico que su adición ocasiona (McLaughlin et al., 1992; Alvarez y Storey, 1993; Gao et al., 1993).



Por otra parte, la utilización de sustancias reguladoras del pH en el medio de congelación, ha contribuido a mejorar el proceso de criopreservación espermática. Los iniciales sistemas tampón a base de glicina y citrato (Ackerman y Behrman, 1975) se han visto mejorados con la incorporación de sistemas tampón bipolares formados por tampón TES (ácido n-tris (hidroximetil) metil 2 amino etanosulfónico) 2-[[1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl]amino]ethanesulfonic acid y TRIS ((hidroximetil) amino metano 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Graham et al., 1972). Diferentes estudios han puesto de manifiesto que el medio de congelación más efectivo utilizado en la congelación de espermatozoides humanos es el constituido por TES-TRIS, glicerol, yema de huevo y citrato (Weidel y Prins, 1987; Stanic et al., 2000; Nallella et al., 2004).

### **1.5.2. Composición de la membrana plasmática.**

La estructura y composición de las membranas plasmáticas juegan un papel primordial en los procesos de criopreservación (Waterhouse et al., 2006; Macías García et al., 2011; Martínez-Soto et al., 2012). Su comportamiento tanto en el proceso de congelación como en el descongelación van a definir la supervivencia celular (Woolley y Richardson, 1978; Parks y Graham, 1992) ya que entre el rango de temperaturas de 10 a -16°C se produce la transición de los lípidos de membrana desde un estado fluido a un estado sólido con el consiguiente aumento de la fragilidad de la membrana (Ávila-Portillo et al., 2006).

La membrana plasmática de la célula eucariota tiene una estructura de mosaico fluido (Singer y Nicholson, 1972). Estas membranas se encuentran compuestas básicamente por lípidos, proteínas y un pequeño porcentaje de carbohidratos. La posición de estas moléculas así como su empaquetamiento en la bicapa lipídica van a determinar la rigidez de las membranas y el transporte de moléculas a través de la misma. En las membranas celulares, los ácidos grasos de los fosfolípidos se posicionan en paralelo y el colesterol se intercala entre ellos. El empaquetamiento de las cadenas hidrofóbicas hace que se produzcan interacciones entre ellas y se estabilicen mediante fuerzas de Van Der Waals. Cuanto menor sea este empaquetamiento la membrana será más fluida.

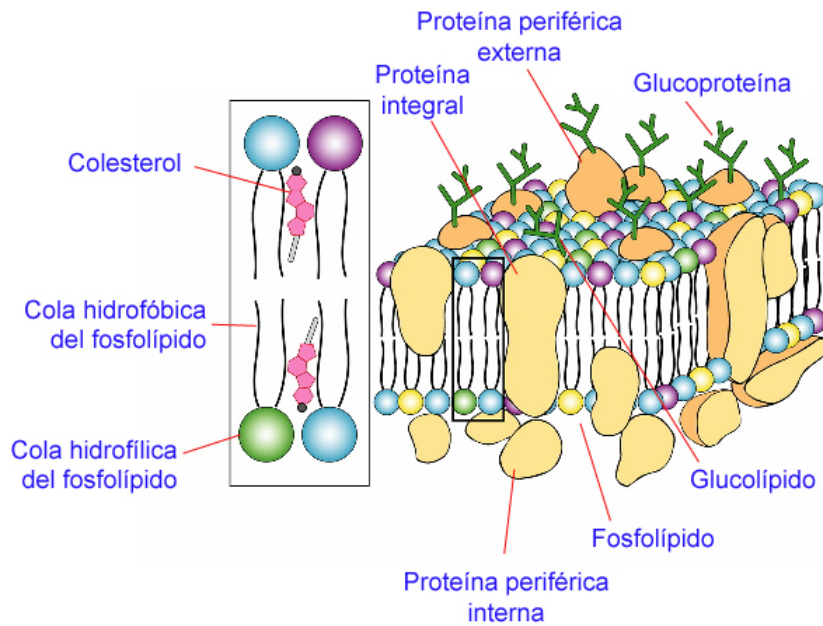


Figura 1. Estructura de mosaico fluido de la membrana plasmática.

Fuente: <http://biologia.iesramonolleros.es>

Por otra parte cuanto más larga es la cadena del ácido graso estas uniones se forman con mayor facilidad y la membrana adquiere mayor rigidez, la existencia de dobles enlaces en las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos de membrana introduce cambios de orientación en las cadenas y hace que estas moléculas no interactúen tan fácilmente y por tanto la membrana aumenta de fluidez. La membrana de los espermatozoides humanos presentan una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), en especial de ácido docosahexanoico (DHA, C22:6 n-3) (Lenzi et al., 1996). La presencia de estos ácidos grasos PUFA confiere a la membrana una gran fluidez y flexibilidad (Israelachvili et al., 1980; Fleming y Yanagimachi, 1981).

El colesterol y los ácidos grasos, como componentes más abundantes de la membrana, determinan la fluidez y resistencia de la misma al proceso de criopreservación. Así, cuanto mayor es la fluidez de la membrana de los espermatozoides antes del proceso de congelación/descongelación mejor es la respuesta de los mismos a dicho proceso (Giraud et al., 2000). El papel del colesterol en la membrana también tiene gran importancia en este proceso de criopreservación, a temperaturas fisiológicas su presencia va a conferir rigidez a la membrana. Sin embargo, al disminuir la temperatura el colesterol impide, por razones estéricas, que las cadenas de ácidos grasos se empaqueten libremente aumentando de esta manera la fluidez de las membranas. La permeabilidad de la membrana está influida por la temperatura, al disminuir la

temperatura del sistema se origina una disminución de su permeabilidad. Así, por debajo de una cierta temperatura la membrana celular se convertirá en impermeable y todo el contenido acuoso que permanezca en su interior será susceptible de quedar transformado en cristales de hielo con el correspondiente daño que puede ocasionar a la célula.

### **1.5.3- Estrés oxidativo y congelación.**

El proceso de congelación-descongelación ocasiona un considerable incremento en la producción de las especies oxígeno reactivas (ROS) (Mazzilli et al., 1995; Wang et al., 1997), principalmente radicales superóxido (Chatterjee y Gagnon, 2001) así como peróxido de hidrogeno (Wang et al., 1997). Estas sustancias ROS son un conjunto de moléculas derivadas del oxígeno con una gran capacidad de reacción debido a su alta inestabilidad química. Dentro de estas moléculas se incluyen radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) o el radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) así como potentes oxidantes como el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) o el peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) (Aitken y Bennetts, 2006).

Estas sustancias reactivas de oxígeno y el balance con las sustancias antioxidantes son fundamentales para el correcto desarrollo de infinidad de procesos celulares. En el espermatozoide podemos destacar su importancia en la capacitación espermática (Aitken et al., 1995; Aitken et al., 1998), la reacción acrosómica y la fusión espermatozoide/ovocito (Gagnon et al., 1991; Aitken, 1997; 1999). Sin embargo, si se produce un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad del sistema antioxidante para neutralizarlos se origina un estrés oxidativo que ocasiona una serie de efectos perjudiciales a nivel celular como son el daño a nivel de ADN (Kodama et al., 1997; Kemal Duru et al., 2000; Aitken y Krausz, 2001), el incremento en los niveles de apoptosis (Wang et al., 2003), la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (peroxidación lipídica) (Alvarez y Storey, 1995) o bien la oxidación de los aminoácidos de las proteínas (Sanocka et al., 1996).

El espermatozoide es una célula especialmente sensible al daño producido por estas sustancias ROS puesto que presenta un gran contenido en ácidos grasos poliinsaturados en la composición de su membrana plasmática (Ahluwalia y Holman, 1969; Poulos y White, 1973). Estos ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) contienen más de dos dobles enlaces carbono-carbono entre los cuales se encuentran los grupos metileno ( $CH_2$ ) que poseen hidrógenos particularmente reactivos. La presencia de este grupo metileno adyacente al doble enlace provoca una unión fácilmente oxidable por ROS.

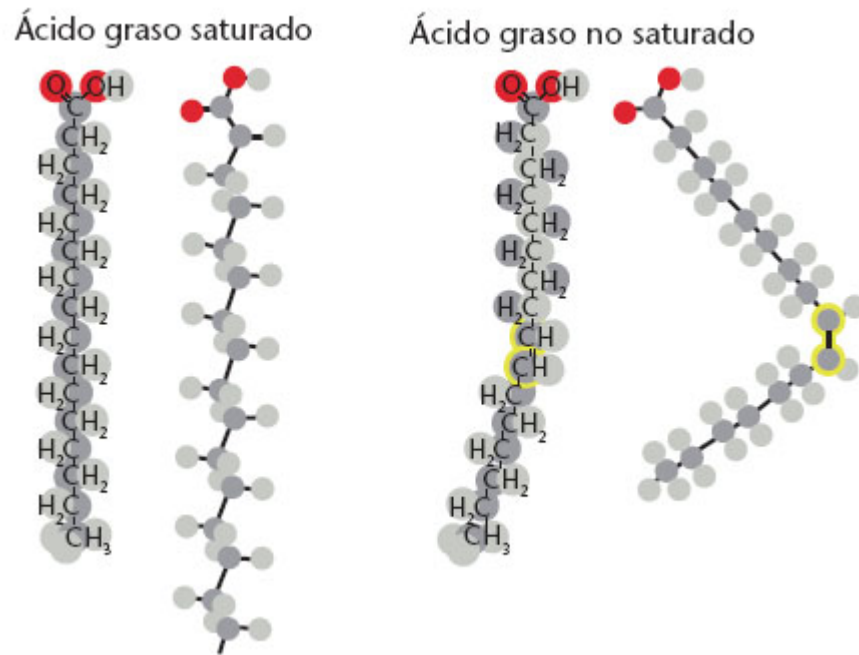


Figura 2. Estructura de los ácidos grasos.

Fuente: [http://www.dfarmacia.com/farma/ctl\\_servlet?\\_f=37&id=13132747](http://www.dfarmacia.com/farma/ctl_servlet?_f=37&id=13132747).

Los espermatozoides y el plasma seminal disponen de varios sistemas enzimáticos y sustancias antioxidantes que contrarrestan o regulan las sustancias reactivas producidas (Aitken y Bennetts, 2006). Las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa son los principales antioxidantes enzimáticos presentes en el eyaculado y convierten el anión superóxido ( $O_2^-$ ) en peróxido de hidrogeno que a su vez se transformará finalmente en  $O_2$  y  $H_2O$  (Jeulin et al., 1989; Lasso et al., 1994; Garrido et al., 2004; Meseguer et al., 2004)

Con objeto de intentar minimizar el daño causado por las sustancias ROS son muchos los investigadores que han postulado la utilización de distintas sustancias antioxidantes en el proceso de criopreservación añadiéndolas tanto al medio de congelación (Gadea et al., 2005; Taylor et al., 2009; Branco et al., 2010; Garcez et al., 2010) como mediante su adición en el proceso de descongelación (Martinez-Soto et al., 2010; Gadea et al., 2011b). Entre las sustancias con actividad antioxidante adicionadas a los medios de congelación y descongelación podemos encontrar enzimas como la catalasa o sustancias de diversas características químicas como el ácido ascórbico, la genisteína, el glutatión reducido, la Pentoxifilina, el resveratrol o la vitamina E con resultados diversos (ver tabla 1). Encontrando en la mayoría de los casos una mejora en

parámetros de calidad seminal que van desde una mejora en los parámetros de motilidad a un menor daño en la fragmentación de ADN tras la descongelación de la muestra (revisado por Zini, 2011).

*Tabla 1. Antioxidantes usados en el proceso de congelación/descongelación de espermatozoides.*

<b>Compuesto</b>	<b>Referencia.</b>
<i>Ac.Ascorbico.</i>	<i>(Askari et al., 1994; Branco et al., 2010; Li et al., 2010)</i>
<i>Catalasa.</i>	<i>(Li et al., 2010; Moubasher et al., 2012)</i>
<i>Genisteina.</i>	<i>(Thomson et al., 2009; Martinez-Soto et al., 2010)</i>
<i>GSH</i>	<i>(Varghese et al., 2005; Gadea et al., 2011a)</i>
<i>Pentoxifilina</i>	<i>(Bell et al., 1993a; Brennan y Holden, 1995; Esteves et al., 1998; Stanic et al., 2002)</i>
<i>Resveratrol</i>	<i>(Branco et al., 2010; Garcez et al., 2010)</i>
<i>Vitamina E</i>	<i>(Askari et al., 1994; Taylor et al., 2009)</i>

#### **1.5.4. Descongelación**

La descongelación consiste en el retorno a la temperatura fisiológica de la célula, en dicho proceso se van a producir los cambios osmóticos inversos a los ocurridos durante el proceso de congelación. El agua congelada cambia a estado líquido, ello conlleva una disminución progresiva de la concentración de solutos extracelular y como consecuencia del efecto osmótico la célula vuelve a hidratarse para compensar esta diferencia de concentraciones (Holt, 2000). Los espermatozoides son más resistentes a la deshidratación que a la rehidratación (Gao et al., 1995), esta es una de las causas, junto con el fenómeno de la recristalización y a que durante la descongelación las defensas antioxidantes del espermatozoide están agotadas (Gadea et al., 2004), que provocan que la descongelación celular sea un proceso crítico en la viabilidad del espermatozoide.

El fenómeno de la recristalización se produce cuando la célula, congelada a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  pasa a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , a esta temperatura algunas moléculas de agua vuelven a estado líquido y son susceptibles de volver a convertirse en pequeños cristales capaces de provocar daños, incluso estos pequeños cristales pueden llegar a asociarse y formar otros de mayor tamaño incrementando así el daño mecánico producido en el espermatozoide (Mazur, 1984).

Con objeto de minimizar este fenómeno se han ensayado distintas velocidades de descongelación llegando al consenso que el ratio óptimo de calentamiento en el proceso de descongelación va a depender del ratio de enfriamiento llevado a cabo en la congelación (Mazur, 1984; Henry et al., 1993). Así, células enfriadas rápidamente son mucho más sensibles a un calentamiento lento que a uno rápido. De igual modo las células enfriadas lentamente mantienen mejor su viabilidad y funcionalidad cuando el protocolo de descongelación es lento (Mazur, 1966; Mahadevan y Trounson, 1984). Los diferentes estudios realizados, por regla general, coinciden en afirmar que el mayor porcentaje de espermatozoides móviles se obtienen en protocolos de descongelación rápidos (Bell et al., 1993b), con el empleo de temperaturas elevadas (Calamera et al., 2010) y que los ratios de descongelación lenta provocan un mayor daño debido a hay un mayor tiempo para que se produzcan los fenómenos de recristalización (Gao et al., 1995). Sin embargo, otros autores no encuentran diferencias en la motilidad espermática dependiendo de la temperatura de descongelación utilizada (McGonagle et al., 2002).

## **2. Presentación de los trabajos**

Debido a las importantes aplicaciones que la criopreservación de espermatozoides tiene en el campo de la reproducción asistida y a la necesidad de mejorar sus resultados son muchas y variadas las investigaciones llevadas a cabo. Estos estudios han abordado diversos aspectos del proceso de criopreservación, desde los ensayos de nuevos protocolos de congelación (Verheyen et al., 1993; Nallella et al., 2004) hasta estudios sobre la alteración que sufre el espermátazoide durante la congelación (Mohammad et al., 1997; Isachenko et al., 2004; Zribi et al., 2010) pasando por la evaluación de la adición de sustancias que mejoren la eficacia del proceso (Barkay et al., 1977; Esteves et al., 1998) o bien estudios sobre los efectos de la recongelación sobre la funcionalidad espermática entre otros. (Verza Jr y Esteves, 2004; Thomson et al., 2010).

A pesar de los numerosos estudios y avances realizados sobre la congelación espermática en los últimos años (Watson, 1995; Royere et al., 1996; Oehninger et al., 2000; Leibo et al., 2002; Mortimer, 2004) a día de hoy no existe un protocolo de congelación - descongelación de espermatozoides estandarizado y universalmente aceptado con el cual conseguir unos resultados óptimos para la inmensa mayoría de las muestras (Nallella et al., 2004). Por otra parte el rendimiento del proceso congelación espermática muestra una gran variabilidad entre pacientes (Centola et al., 1992; McLaughlin et al., 1992) por causas que hasta el momento no han sido totalmente clarificadas.

Por tanto, parece necesario profundizar en el estudio de los factores que van a determinar el éxito de la congelación-descongelación de los espermatozoides, lo que nos permitirá mejorar el rendimiento y eficacia de los mismos y beneficiará sin duda alguna a su empleo en los tratamientos de reproducción asistida.

En la presente Tesis doctoral se han analizado una serie de factores que pueden influir en la mejora del proceso de criopreservación de espermatozoides humanos como son modificaciones en los protocolos de descongelación espermática, la adición de una sustancia con actividad antioxidante como la genisteína y la influencia que el contenido en ácidos grasos de la muestra seminal tiene en el éxito de la congelación. Los dos primeros factores pueden ser considerados como extrínsecos mientras que el tercero es de tipo intrínseco.



La elección de estos factores se ha basado en diversos motivos. En primer lugar, la descongelación es un paso crítico en la criopreservación espermática y consideramos que no había sido suficientemente estudiado, al menos en lo referente al empleo de muestras congeladas en pellets producidos sobre bloques de nieve carbónica. En segundo lugar, la adición de antioxidantes tanto al medio de congelación como de descongelación ha sido una constante a la hora de mejorar el proceso de criopreservación. En nuestro trabajo seleccionamos la genisteína por ser una sustancia que presenta dos propiedades interesantes, por un lado tiene una capacidad antioxidante reconocida (Thomson et al., 2009) y por otra es un inhibidor de la proteína tirosin quinasa (Akiyama et al., 1987; Menzel et al., 2007), con lo cual podría tener un efecto beneficioso adicional al regular los procesos de capacitación que ocurren durante la congelación, prolongando así el tiempo de utilización de las muestras congeladas. Por último, se pretende encontrar marcadores biológicos capaces de predecir el resultado del procedimiento de congelación-descongelación. La composición de la membrana del espermatozoide se ha demostrado esencial en el proceso de congelación, especialmente en lo referente a la composición en ácidos grasos, los cuales confieren al espermatozoide de unas características singulares. Por ello pretendíamos estudiar la relación existente entre el contenido de ácidos grasos de la muestra seminal, así como la capacidad antioxidante total del plasma seminal con la calidad seminal y la criotolerancia.

Para desarrollar estos estudios hemos empleado las técnicas analíticas más avanzadas que están a nuestra disposición como son los sistemas CASA con cámaras de alta frecuencia (Amann y Katz, 2004; Freour et al., 2009), citometría de flujo (Garrido et al., 2002a; Cordelli et al., 2005; Silva y Gadella, 2006; Martinez-Pastor et al., 2010), análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Lepage y Roy, 1986), técnicas de electroforesis asociadas a análisis de imagen (Fernández-Gonzalez et al., 2008), espectrofotometría (Mahfouz et al., 2009) y microscopía de fluorescencia (Silva y Gadella, 2006) con las cuales obtenemos resultados de mayor precisión y reproductibilidad y nos permite definir nuevos parámetros a la hora de evaluar el daño en el espermatozoide además de los tradicionales de viabilidad y motilidad espermática.

Los tres trabajos han sido publicados en revistas de ámbito internacional recogidas en bases de datos como JCR o Scopus.

Martínez-Soto, J.C., Garcia-Vazquez, F.A., Gumbao, D., Landeras, J., Gadea, J., 2011. Assessment of two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellets. *Cryobiology* 63, 131-136.

Martínez-Soto, J.C., de DiosHourcade, J., Gutierrez-Adan, A., Landeras, J.L., Gadea, J., 2010. Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. *Asian J Androl* 12, 431-441.

Martínez-Soto, J.C., Landeras, J., Gadea, J., 2012. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*. Article first published online: 29 NOV 2012. DOI:10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x

## 2.1. Objetivos generales y específicos

Los trabajos presentados en esta Tesis doctoral tienen por objetivo general estudiar diversos factores tanto extrínsecos como intrínsecos que afectan a la eficacia de los procesos de congelación espermática. Por tanto, van encaminados a aportar información sobre determinados puntos críticos del proceso de congelación/descongelación a la vez que pretende determinar algunas de las causas que justifiquen la gran diferencia interindividual encontrada en el proceso objeto de estudio. Esto nos ayudará a establecer estrategias encaminadas a disminuir esta variabilidad, mejorar los protocolos de congelación/descongelación consiguiendo finalmente una mejora de los resultados reproductivos.

Los objetivos específicos de cada una de las secciones son los siguientes.

**Trabajo 1-** Evaluar un protocolo de descongelación de espermatozoides congelados en píldoras alternativo al método habitual utilizado. Este nuevo método presenta una mayor velocidad de descongelación que el método de referencia y permite una rápida dilución del crioprotector (glicerol).

**Trabajo 2-** Estudiar de los efectos de la suplementación del medio de descongelación de espermatozoides con genisteia, isoflavona de reconocida capacidad antioxidante e inhibidor de la protein tirosin quinasa.

**Trabajo 3.-** Analizar la relación entre la composición en ácidos grasos de la membrana de los espermatozoides y la del plasma seminal con la calidad seminal tras el proceso de congelación-descongelación. Así como estudiar la relación existente entre la capacidad antioxidante total (TAC) del plasma seminal con el contenido en ácidos grasos y el éxito del proceso de criopreservación.

## 2.2. Resumen global de los resultados

Los dos primeros trabajos que forman parte de esta Tesis doctoral evalúan factores extrínsecos del proceso de criopreservación como son el proceso de descongelación y la adición de antioxidantes a los medios de congelación y descongelación (Martínez-Soto et al., 2010; Martínez-Soto et al., 2011).

Como ya hemos indicado anteriormente, el proceso de descongelación es uno de los puntos críticos en la criopreservación espermática debido a la existencia de fenómenos de recristalización y a la mayor sensibilidad que presenta la célula en el momento de la rehidratación (Gao et al., 1995). En el **estudio 1** se comparan dos diferentes métodos de descongelación de espermatozoides, el método habitualmente utilizado (M1) donde las muestras son mantenidas 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente otros 10 minutos a 37°C, frente al método alternativo (M2) en el cual la muestra se deposita directamente en un tubo con medio atemperado a 37°C y se mantiene 20 minutos a esa temperatura. Las ventajas esperadas de este procedimiento alternativo serían un aumento en el ratio de temperatura de descongelación, así como una rápida dilución del crioprotector lo que ocasionaría un menor tiempo de exposición y menor daño al espermatozoide.

En el **estudio 2** se evalúa el efecto que la adición de Genisteína al medio de congelación y descongelación ocasiona en la funcionalidad espermática. Así, las muestras seminales fueron descongeladas y se incubaron en presencia de Genisteína en concentraciones finales de 0, grupo control, 1 y 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Las muestras se mantuvieron a 37°C durante 60 minutos antes de realizar los análisis correspondientes.

Al estudiar la **motilidad espermática**, apreciamos que los dos métodos de descongelación ofrecen valores similares en términos de porcentaje de motilidad y motilidad progresiva (estudio 1). Sin embargo, la descongelación rápida con medio atemperado supone una mejora en la mayoría de los parámetros cinéticos evaluados mediante CASA a excepción de la amplitud lateral de desplazamiento de cabeza (ALH). La mejora en los parámetros cinéticos ocasionada con este protocolo de descongelación se ve confirmada al analizar las distintas subpoblaciones de espermatozoides móviles por un análisis de "cluster". Así, encontramos que la descongelación siguiendo el nuevo protocolo supone un mayor porcentaje de espermatozoides con velocidad

lineal rápida, a la vez que disminuye los que presentan velocidad lineal media o los espermatozoides lentos con motilidad no lineal.

La adición de genisteína en diferentes concentraciones al medio de congelación o descongelación tiene un efecto limitado en la motilidad espermática. Únicamente destacaríamos que la adición de 10  $\mu\text{M}$  de genisteína al medio de descongelación ocasiona un aumento en el porcentaje de motilidad total y una disminución en la frecuencia de batido del flagelo (BCF). El resto de parámetros cinéticos no se ven afectados.

La producción de **sustancias reactivas al oxígeno (ROS)** ocasionada durante el proceso de criopreservación es un hecho sobradamente demostrado (Alvarez y Storey, 1992; Wang et al., 1997) Al evaluar los efectos ocasionados al utilizar medio atemperado a 37°C en los protocolos de descongelación (**estudio 1**), observamos que la generación de ROS no se ve modificada por el método de descongelación utilizado. Por el contrario la adición de genisteína al medio de descongelación en concentraciones de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (**estudio 2**) origina una disminución en la producción de sustancias Ros, que confirma la capacidad antioxidante de esta sustancia a dicha concentración.

Durante el proceso de congelación se originan alteraciones estructurales de la membrana que determinan la **viabilidad** de la célula y también se producen **modificaciones de la fluidez de la membrana lipídica** similares, en cierto, modo a las que acontecen durante el proceso de capacitación espermática (Watson 1995). Tanto la descongelación con el medio caliente (M2) como la adición de genisteína al medio de descongelación suponen un incremento en el número de espermatozoides viables y con bajo desorden lipídico. Además, nuestros datos indican que la descongelación siguiendo el protocolo alternativo (M2) supone una disminución en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma alterado.

El fenómeno de la **hipercondensación de la cromatina** durante el proceso de criopreservación es un fenómeno ampliamente estudiado y relacionado con una alteración entre las interacciones que se producen entre el ADN espermático y las proteínas nucleares (Royere et al., 1988; Hamamah et al., 1990; Hammadeh y Georg, 1999). Este parámetro puede ser usado como parámetro indicador del daño producido en el proceso de congelación (Hammadeh y Georg, 1999) y debe ser un factor a considerar a la hora de la utilización de muestras de semen congelado (Madrid-Bury et al., 2005).

Los resultados obtenidos en ambos trabajos demuestran que se produce una menor condensación de la cromatina en los espermatozoides tanto al descongelar con medio suplementado con  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Genisteína como al realizar la descongelación mediante el método M2. Además hemos constatado que la adición de genisteína en las concentraciones objeto de estudio ocasiona una disminución en el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado tanto en las mediciones realizadas con Túnel (citometría de flujo) como con el test del cometa.

En resumen, podemos decir que la mejora en factores externos como el protocolo de descongelación como la adición de antioxidantes al medio de descongelación supone una mejora limitada pero significativa de la mayor parte de los parámetros espermáticos analizados, que podría suponer una mejora en la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados. Este último extremo debe ser confirmado con estudios que evalúen la capacidad fecundante en sistemas de inseminación artificial y fecundación in vitro.

Las mejoras observadas al aplicar un protocolo de descongelación por inmersión directa de los pellets en medio atemperado podrían estar asociadas tanto al incremento en el ratio de velocidad de descongelación o como a la rápida dilución del glicerol evitando los potenciales efectos dañinos que puede ejercer sobre la célula espermática. En cualquier caso para conocer en detalle la importancia relativa de cada uno de estos factores sería necesario diseñar nuevos experimentos donde se analizara de modo individual y simultáneo el efecto de ambos factores.

En el tercer trabajo presentado (Martínez-Soto et al., 2012) se aborda el estudio de factores intrínsecos de la muestra seminal como son la composición lipídica del espermatozoide y del plasma seminal o la capacidad antioxidante del plasma seminal. Con el objetivo de relacionar estas variables con los parámetros espermáticos antes y después de la congelación.

De los datos del estudio se confirma que la composición de ácidos grasos de la membrana plasmática difiere de la del plasma seminal en la inmensa mayoría de ácidos grasos evaluados. Así encontramos en membrana mayores valores de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA),  $\omega 3$  y  $\omega 6$  que los encontrados en plasma seminal predominando el DHA tanto en membrana como en plasma seminal. Por el contrario los valores de ácidos grasos saturados (SFA) especialmente ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) ácido oleico (C18:1n9) y los ratios  $\omega 6/\omega 3$ , SFA/PUFA son mayores en plasma seminal que los encontrados en membrana espermática.

Al analizar los datos de composición lipídica en función de las características de las muestras, encontramos diferencias en la composición de ácidos grasos y capacidad antioxidante entre los distintos grupos, normozoospermicos, oligozoospermicos, astenozoospermicos y oligoastenozoospermicos, hecho constatado con anterioridad por otros autores (Zalata et al., 1998; Conquer et al., 1999; Calamera et al., 2003). Encontrando que los espermatozoides del grupo de pacientes normozoospermicos presentaban niveles superiores de PUFA, en concreto de DHA (C22:6n3) que en el resto de los grupos a la vez que se observan valores menores de SFA y MUFA. De igual modo, las relaciones entre los niveles de  $\omega 6/ \omega 3$  y el ratio SFA/PUFA fue menor en las muestras normozoospermicas en comparación con el resto de los grupos.

En el plasma seminal se encontraron valores de MUFA inferiores en las muestras de los pacientes normozoospermicos en comparación con los oligoastenozoospermicos, mientras que los valores de PUFA y total de  $\omega 3$  estaban incrementados en relación a los pacientes oligozoospermicos y oligoastenozoospermicos. No se observaron diferencias en cuanto a las concentraciones de SFA entre los distintos grupos. Es de destacar que en los niveles de ácidos grasos en plasma seminal entre los grupos de normozoospermicos y astenozoospermicos no se encontraron diferencias. Por otra parte, la capacidad antioxidante total (TAC) del plasma seminal se encuentra disminuida en las muestras pertenecientes al grupo de oligozoospermicos y oligoastenozoospermicos en relación a los que presentan los casos normozoospermicos y astenozoospermicos.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman que la composición de ácidos grasos tanto en membrana como en plasma seminal está relacionada con la funcionalidad espermática. Al analizar la correlación existente entre la composición de los ácidos grasos de los espermatozoides con los parámetros seminales de la muestra seminal recién obtenida (previamente al proceso de congelación), encontramos una correlación positiva entre los valores de PUFA, total de  $\omega 3$ , DHA y ácido araquidónico (C20:4n6) con los parámetros seminales analizados (motilidad, viabilidad, morfología y recuento total de espermatozoides en eyaculado). Por el contrario existe una correlación inversa de dichos parámetros seminales con SFA, MUFA, ratio  $\omega 6/\omega 3$  y SFA/PUFA.

Al estudiar la correlación de dichos parámetros seminales con la composición lipídica del plasma seminal apreciamos que la viabilidad espermática no se correlaciona con ningún ácido graso. Sin embargo la cantidad de DHA presente en el plasma seminal estaba relacionado con

motilidad, morfología y número total de espermatozoides en eyaculado. El contenido en MUFA en plasma seminal se correlacionaba negativamente con morfología y recuento total de espermatozoides al igual que los ratios  $\omega 6/\omega 3$  y SFA/PUFA estaban inversamente correlacionados con el recuento espermático.

Los resultados de esta correlación están en general en concordancia con otros estudios donde se aprecia que los valores de DHA y PUFA se correlacionan directamente con los parámetros seminales, mientras que los valores de MUFA se correlacionan de forma inversa con las características espermáticas (Nissen y Kreysel, 1983; Zalata et al., 1998; Aksoy et al., 2006; Tavilani et al., 2006).

La relación entre la capacidad antioxidante del plasma seminal y su relación con la composición de ácidos grasos también ha sido objeto de análisis. Encontrando que la composición lipídica del plasma seminal puede tener una gran influencia en la capacidad antioxidante y por ende en la funcionalidad espermática. Encontramos que la concentración de PUFA está directamente correlacionada con TAC mientras que hayamos una correlación inversa con SFA y MUFA. Al estudiar esta relación con los ácidos grasos en espermatozoides apreciamos una menor relación y en ocasiones en sentido contrario a la que encontramos al analizar la correlación con el plasma seminal.

La importancia de la composición de la membrana lipídica en el proceso de criopreservación ha sido reconocida desde hace años (White, 1993). En la congelación/descongelación de espermatozoides llegan a producirse alteraciones en la composición lipídica, que llevan a la reducción de la concentración de determinados ácidos grasos PUFA (C18:2, C20:3, C20:4 y C:22:6n3) y al incremento en la proporción de SFA (Alvarez y Storey, 1992). En el mismo sentido (Schiller et al., 2000) confirman que el proceso de criopreservación modifica el perfil de fosfolípidos en lo espermatozoides. Estas modificaciones en la composición lipídica de los espermatozoides congelados van a causar un aumento en la rigidez de la membrana (Giraud MN et al., 2000) a la vez que una reducción en la difusión de lípidos en la membrana (James et al., 1999).

En nuestro estudio encontramos una correlación positiva entre los valores de DHA (C22:6n3), PUFA y total  $\omega 3$  en espermatozoides con los parámetros seminales tras la descongelación. Por el contrario, se observó una relación inversa con SFA, MUFA, ratio  $\omega 6/\omega 3$  y SFA/PUFA. Referente a la composición del plasma seminal, al igual que en el caso de las muestras



en fresco, no está relacionado con la viabilidad celular tras descongelación pero algunos ácidos grasos como DHA (C22:6n3),  $\omega$ 6, C18:0 y ratio  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 están relacionados con la motilidad y/o algunos de los parámetros cinéticos evaluados.

Por otra parte encontramos el plasma seminal de los eyaculados que tuvieron los espermatozoides con mayor velocidad (VAP, VSL) tras el proceso de congelación/descongelación presentaron mayores valores de TAC.

Los resultados confirman que el contenido en ácidos grasos PUFA, en especial el DHA (C22:6n3) tanto en espermatozoide como en plasma seminal, condiciona el resultado del proceso de congelación/descongelación. Estos resultados se explican por la influencia que en la fluidez de la membrana tienen los PUFA, este hecho ya fue postulado por Giraud al afirmar que el resultado de la fluidez de membrana era un factor predictivo la criopreservación de espermatozoides (Giraud MN et al., 2000). La fluidez de la membrana también favorece la inserción del crioprotector facilitando la deshidratación previa a la congelación y por ello favoreciendo la supervivencia celular. Sin embargo un exceso en la fluidez de la membrana también podría ejercer un efecto perjudicial para el resultado del proceso (Miller et al., 2005)

Las diferencias individuales en el resultado del criopreservación son bien conocidas aunque los factores que los ocasionan no están del todo establecidos (Centola et al., 1992). Algunos estudios sugieren que existe una explicación genética a estas variaciones (Thurston et al., 2001; Thurston et al., 2002). Según los datos resultantes de este estudio podríamos afirmar que las diferencias son debidas, al menos en parte, a la distinta composición en ácidos grasos del eyaculado objeto de criopreservación. Este estudio nos abre la posibilidad de plantear nuevos trabajos en este campo de investigación bien para estudiar bases genéticas que puedan influir en la composición de ácidos grasos o bien para desarrollar estrategias encaminadas a modificar la composición lipídica y así obtener una mejora en el resultado de la criopreservación de espermatozoides.

### 2.3. Conclusiones finales

- El protocolo de descongelación afecta a la calidad seminal de las muestras congeladas.
- La descongelación directa sobre el medio atemperado supone una mejora limitada pero significativa de los parámetros seminales: movimiento linear rápido, estructura del acrosoma, condensación de cromatina y espermatozoides viables con bajo desorden de membrana.
- La adición de genisteína al medio de descongelación a las concentraciones objeto de estudio ( $10 \mu\text{molL}^{-1}$ ) ejerce una acción antioxidante en los espermatozoides sometidos al proceso de congelación/descongelación
- La adición de genisteína supone una mejora en el número de espermatozoides viables con bajo grado de desorden lipídico y ejerce un efecto protector en el ADN espermático.
- Existe una diferente composición de ácidos grasos entre plasma seminal y espermatozoides.
- La composición de ácidos grasos en plasma seminal y espermatozoides esta correlacionada con los parámetros seminales en fresco y la capacidad antioxidante total.
- Las concentraciones de PUFA,  $\omega 3$ , y DHA en los espermatozoides están directamente relacionados con la viabilidad y motilidad tras descongelación.
- La concentración de MUFA en los espermatozoides está inversamente relacionada la viabilidad y motilidad tras descongelación.

### **3. Referencias bibliográficas**

- AbdelHafez, F., Bedaiwy, M., El-Nashar, S.A., Sabanegh, E., Desai, N., 2009. Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. *Human Reproduction Update* 15, 153-164.
- Ackerman, D., Behrman, S., 1975. Artificial insemination and preservation of human semen. *Progress in Infertility*, 2nd edition. Little, Brown and Co, Boston, USA, 765-778.
- Agboghoroma, C.O., Giwa-Osagie, O.F., 2012. Management of Infertility in HIV infected couples: A Review. *African Journal of Reproductive Health* 16, 13-20.
- Ahluwalia, B., Holman, R., 1969. Fatty acid composition of lipids of bull, boar, rabbit and human semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 18, 431-437.
- Ahuja, K.K., Mamiso, J., Emmerson, G., Bowen-Simpkins, P., Seaton, A., Simons, E.G., 1997. Pregnancy following intracytoplasmic sperm injection treatment with dead husband's spermatozoa: ethical and policy considerations. *Human Reproduction* 12, 1360-1363.
- Aitken, R., Harkiss, D., Knox, W., Paterson, M., Irvine, D., 1998. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *Journal of Cell Science* 111, 645-656.
- Aitken, R., Paterson, M., Fisher, H., Buckingham, D., Van Duin, M., 1995. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal of Cell Science* 108, 2017-2025.
- Aitken, R.J., 1997. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Molecular Human Reproduction* 3, 169-173.
- Aitken, R.J., 1999. The Amoroso Lecture The human spermatozoon-a cell in crisis? *Reproduction* 115, 1-7.
- Aitken, R.J., Bennetts, L., 2006. Reactive oxygen species: friend or foe. *The Sperm Cell*. New York: Cambridge University Press. p, 170-193.
- Aitken, R.J., Krausz, C., 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122, 497-506.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., Fukami, Y., 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 262, 5592-5595.
- Aksoy, Y., Aksoy, H., Altinkaynak, K., Aydın, H.R., Özkan, A., 2006. Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 75, 75-79.
- Alvarez, J., Storey, B., 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology* 13, 232-241.

- Alvarez, J., Storey, B., 1993. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *Journal of Andrology* 14, 199-209.
- Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 42, 334-346.
- Amann, R.P., Katz, D.F., 2004. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology* 25, 317-325.
- Amelar, R., Dubin, L., 1980. For donor insemination do you prefer fresh or frozen semen? What are the bases for your preferences? *International Journal of Fertility* 25, 4-15.
- Anger, J.T., Gilbert, B.R., Goldstein, M., 2003. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *The Journal of Urology* 170, 1079-1084.
- Askari, H., Check, J., Peymer, N., Bollendorf, A., 1994. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 33, 11-15.
- Ávila-Portillo, L.M., Madero, J.I., López, C., León, M.F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L.G., Lozano, J.M., Reguero, M.T., 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 57, 291-300.
- Baker, H., 2000. Management of male infertility. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 14, 409-422.
- Barkay, J., Zuckerman, H., Sklan, D., Gordon, S., 1977. Effect of caffeine on increasing the motility of frozen human sperm. *Fertility and Sterility* 28, 175-177.
- Behrman, S., Sawada, Y., 1966. Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. *Fertility and Sterility* 17, 457-466.
- Bell, M., Wang, R., Hellstrom, W., Sikka, S., 1993. Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *Journal of Andrology* 14, 472-478.
- Benson, J.D., Woods, E.J., Walters, E.M., Critser, J.K., 2012. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* 78, 1682-1699.
- Bielanski, A., Vajta, G., 2009. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Human Reproduction* 24, 2457-2467.
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J.A., Nygren, K.G., 2007. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction* 22, 1506-1512.

- Borges, E., Rossi, L.M., Locambo de Freitas, C.V., Guilherme, P., Bonetti, T.C.S., Iaconelli, A., Pasqualotto, F.F., 2007. Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Fertility and Sterility* 87, 316-320.
- Boue, F., Bérubé, B., De Lamirande, E., Gagnon, C., Sullivan, R., 1994. Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein. *Biology of Reproduction* 51, 577-587.
- Branco, C.S., Garcez, M.E., Pasqualotto, F.F., Erdtman, B., Salvador, M., 2010. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology* 60, 235-237.
- Brennan, A.P., Holden, C.A., 1995. Andrology: Pentoxifylline-supplemented cryoprotectant improves human sperm motility after cryopreservation. *Human Reproduction* 10, 2308-2312.
- Bunge, R.G., Sherman, J.K., 1953. Fertilizing Capacity of Frozen Human Spermatozoa. *Nature* 172, 767-768.
- Calamera, J., Buffone, M., Ollero, M., Alvarez, J., Doncel, G., 2003. Superoxide dismutase content and fatty acid composition in subsets of human spermatozoa from normozoospermic, asthenozoospermic, and polyzoospermic semen samples. *Molecular Reproduction and Development* 66, 422-430.
- Calamera, J.C., Buffone, M.G., Doncel, G.F., Brugo-Olmedo, S., de Vincentiis, S., Calamera, M.M., Storey, B.T., Alvarez, J.G., 2010. Effect of thawing temperature on the motility recovery of cryopreserved human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 93, 789-794.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E., 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 305, 609-613.
- Centola, G., Mattox, J., Burde, S., Leary, J., 1990. Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen thawed human spermatozoa using single wavelength fluorescence microscopy. *Molecular Reproduction and Development* 27, 130-135.
- Centola, G., Raubertas, R., Mattox, J., 1992. Cryopreservation of human semen. Comparison of cryopreservatives, sources of variability, and prediction of post-thaw survival. *Journal of Andrology*. 13, 283-288.
- Clarke, G., Liu, D., Baker, H., 2004. Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. *Reproduction, Fertility and Development* 15, 377-381.
- Clarke, G.N., 1999. Sperm cryopreservation: is there a significant risk of cross-contamination? *Human Reproduction* 14, 2941-2943.
- Conquer, J., Martin, J., Tummon, I., Watson, L., Tekpetey, F., 1999. Fatty acid analysis of blood serum, seminal plasma, and spermatozoa of normozoospermic vs. Asthenozoospermic males. *Lipids* 34, 793-799.

- Cordelli, E., Eleuteri, P., Leter, G., Rescia, M., Span, M., 2005. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception* 72, 273-279.
- Critser, J., Huse-Benda, A., Aaker, D., Arneson, B., Ball, G., 1988. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertility and Sterility* 50, 314-320.
- Cross, N.L., Hanks, S.E., 1991. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Human Reproduction* 6, 1279-1283.
- Curry, M.R., 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reproduction* 5, 46-52.
- Chatterjee, S., Gagnon, C., 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development* 59, 451-458.
- Chen, S.U., Ho, H.N., Chen, H.F., Huang, S.C., Lee, T.Y., Yang, Y.S., 1996. Andrology: Pregnancy achieved by intracytoplasmic sperm injection using cryopreserved semen from a man with testicular cancer. *Human Reproduction* 11, 2645-2647.
- da Silva, B.F., Borrelli Jr, M., Fariello, R.M., Restelli, A.E., Del Giudice, P.T., Spaine, D.M., Bertolla, R.P., Cedenho, A.P., 2010. Is sperm cryopreservation an option for fertility preservation in patients with spinal cord injury-induced anejaculation? *Fertility and Sterility* 94, 564-573.
- De Kretser, D., 1997. Male infertility. *Lancet* 349, 787-790.
- de Mouzon, J., Goossens, V., Bhattacharya, S., Castilla, J., Ferraretti, A., Korsak, V., Kupka, M., Nygren, K., Andersen, A.N., 2012. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 27, 954-966.
- Desrosiers, P., Légaré, C., Leclerc, P., Sullivan, R., 2006. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. *Fertility and Sterility* 85, 1744-1752.
- Devroey, P., Silber, S., Nagy, Z., Liu, J., Tournaye, H., Joris, H., Verheyen, G., Steirteghem, A.V., 1995. Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Human Reproduction* 10, 903-906.
- Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., Borini, A., 2012. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances in Urology* 2012, 854837.
- Donnelly, E.T., Steele, E.K., McClure, N., Lewis, S.E.M., 2001. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Human Reproduction* 16, 1191-1199.
- Drobnis, E., Crowe, L., Berger, T., Ancho doguy, T., Overstreet, J., Crowe, J., 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology* 265, 432-437.

- Dunson, D.B., Baird, D.D., Colombo, B., 2004. Increased infertility with age in men and women. *Obstetrics & Gynecology* 103, 51-56.
- Endo, Y., Fujii, Y., Kurotsuchi, S., Motoyama, H., Funahashi, H., 2012a. Successful delivery derived from vitrified-warmed spermatozoa from a patient with nonobstructive azoospermia. *Fertility and Sterility* 98, 1423-1427.
- Endo, Y., Fujii, Y., Shintani, K., Seo, M., Motoyama, H., Funahashi, H., 2012b. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online* 24, 301-307.
- Englert, Y., Van Vooren, J.P., Place, I., Liesnard, C., Laruelle, C., Delbaere, A., 2001. ART in HIV-infected couples Has the time come for a change of attitude? *Human Reproduction* 16, 1309-1315.
- Esteves, S.C., Sharma, R.K., Thomas, A.J., Agarwal, A., 1998. Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate. *Human Reproduction* 13, 3384-3389.
- Fernández-Gonzalez, R., Moreira, P., Pérez-Crespo, M., Sánchez-Martín, M., Ramirez, M., Pericuesta, E., Bilbao, A., Bermejo-Alvarez, P., De Dios Hourcade, J., De Fonseca, F., Gutiérrez-Adán, A., 2008. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biology of Reproduction* 78, 761-772.
- Fleming, A.D., Yanagimachi, R., 1981. Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete Research* 4, 253-273.
- Freour, T., Jean, M., Mirallie, S., Langlois, M.L., Dubourdieu, S., Barriere, P., 2009. Predictive value of CASA parameters in IUI with frozen donor sperm. *International Journal of Andrology* 32, 498-504.
- Gadea, J., Gumbao, D., Matas, C., Romar, R., 2005. Supplementation of the Thawing Media With Reduced Glutathione Improves Function and the In Vitro Fertilizing Ability of Boar Spermatozoa After Cryopreservation. *Journal of Andrology* 26, 749-756.
- Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M.A., Garcia-Vazquez, F.A., Gardon, J.C., 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 62, 40-46.
- Gagnon, C., Iwasaki, A., Lamirande, E., Kovalski, N., 1991. Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa. *Annals of the New York Academy of Sciences* 637, 436-444.
- Gamzu, R., Yogev, L., Botchan, A., Amit, A., Lessing, J., Lichtenberg, D., Paz, G., Yavetz, H., 1997. Effect of sperm preparation with TEST yolk buffer on sperm-binding capacity under hemizona assay conditions. *Andrologia* 29, 17-21.
- Gao, D., Ashworth, E., Watson, P., Kleinhans, F., Mazur, P., Critser, J., 1993. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction* 49, 112-123.



- Gao, D., Liu, J., Liu, C., McGann, L., Watson, P., Kleinhans, F., Mazur, P., Critser, E., Critser, J., 1995. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction* 10, 1109-1122.
- Gao, D., Mazur, P., Critser, J., 1997. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. *Reproductive Tissue Banking*. Academic Press, San Diego, CA, 263-328.
- Garcez, M.E., Branco, C.S., Lara, L.V., Pasqualotto, F.F., Salvador, M., 2010. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertility and Sterility* 94, 2118-2121.
- Garrido, N., Gonzalez-Ravina, C., Pellicer, A., Cuapio, P., Martinez, J.C., Pacheco, A., 2010. Significant parameters affecting livebirth rate in intrauterine insemination (IUI) and in vitro fertilization (IVF) using donor's sperm: a retrospective study in more than 12,000 cycles. *Fertility and Sterility*. 94, S56.
- Garrido, N., Meseguer, M., Alvarez, J., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J., 2004. Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*. 82 Suppl 3, 1059.
- Garrido, N., Meseguer, M., Remohi, J., Pellicer, A., Simón, C., 2002a. Flow cytometry in human reproductive biology. *Gynecological Endocrinology* 16, 505-521.
- Garrido, N., Meseguer, M., Simón, C., Pellicer, A., Remohí, J., 2002b. Factores influyentes en los resultados de la congelación y descongelación del semen humano. *ASEBIR* 7, 21-28.
- Gerris, J., Mangelschots, K., Van Royen, E., Joostens, M., Eestermans, W., Ryckaert, G., 1995. ICSI and severe male-factor infertility: breaking the sperm tail prior to injection. *Human Reproduction* 10, 484-485.
- Gianaroli, L., Magli, M.C., Stanghellini, I., Crippa, A., Crivello, A.M., Pescatori, E.S., Ferraretti, A.P., 2012. DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 97, 1067-1073.e1.
- Gil Salom, M., Romero, J., Ménguez, Y., Rubio, C., De los Santos, M., Remohí, J., Pellicer, A., 1996. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Human Reproduction* 11, 1309-1313.
- Giraud MN, Motta C, Boucher D, G., G., 2000. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Human Reproduction* 15, 2160-2164.
- Glander, H., Luppá, D., 1979. [Effect of pellet size on respiratory activity and motility of cryopreserved spermatocytes]. *Dermatologische Monatschrift* 165, 286.

- Glander, H.J., Schaller, J., 1999. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Molecular Human Reproduction* 5, 109-115.
- Graham, E., Crabo, B., Brown, K., 1972. Effect of some zwitter ion buffers on the freezing and storage of spermatozoa I. *Bull. Journal of Dairy Science* 55, 372-378.
- Hamamah, S., Royere, D., Nicolle, J., Paquignon, M., Lansac, J., 1990. Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reproduction Nutrition Development* 30, 59-64.
- Hammadeh, A., Georg, R., 1999. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *International Journal of Andrology* 22, 155-162.
- Hammadeh, M., Dehn, C., Hippach, M., Zeginiadou, T., Stieber, M., Georg, T., Rosenbaum, P., Schmidt, W., 2001. Comparison between computerized slow-stage and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterious effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men. *International Journal of Andrology* 24, 66-72.
- Harrison, R.F., Sheppard, B.L., 1980. A comparative study in methods of cryoprotection for human semen. *Cryobiology* 17, 25-32.
- Henry, M., Noiles, E., Gao, D., Mazur, P., Critser, J., 1993. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertility and Sterility* 60, 911-918.
- Hoagland, H., Pincus, G., 1942. Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen. *Journal of General Physiology* 25, 337-339.
- Hochi, S., Abdalla, H., Hara, H., Hirabayashi, M., 2011. Challenging endeavour for preservation of freeze-dried mammalian spermatozoa. *Journal Reproduction and Development* 57, 557-563.
- Holt, W., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 62, 3-22.
- Holt, W., North, R., 1991. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 91, 451-461.
- Hourvitz, A., Goldschlag, D.E., Davis, O.K., Gosden, L.V., Palermo, G.D., Rosenwaks, Z., 2008. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using cryopreserved sperm from men with malignant neoplasm yields high pregnancy rates. *Fertility and Sterility* 90, 557-563.
- Irvine, S., Cawood, E., Richardson, D., MacDonald, E., Aitken, J., 1996. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ* 312, 467-471.

- Isachenko, E., Isachenko, V., Weiss, J., Kreienberg, R., Katkov, I., Schulz, M., Lulat, A.G.M.I., Risopatrón, M., Sanchez, R., 2008. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction* 136, 167-173.
- Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I.I., Montag, M., Dessolet, S., Nawroth, F., van der Ven, H., 2004. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biology of Reproduction* 71, 1167-1173.
- Isachenko, V., Isachenko, E., Montag, M., Zaeva, V., Krivokharchenko, I., Nawroth, F., Dessolet, S., Katkov, I.I., der Ven, H., 2005. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online* 10, 350-354.
- Israelachvili, J., Mar elja, S., Horn, R.G., 1980. Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics* 13, 121-200.
- James, P., Wolfe, C., Mackie, A., Ladha, S., Prentice, A., Jones, R., 1999. Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Human Reproduction* 14, 1827-1999.
- Jeulin, C., Soufir, J., Weber, P., Laval Martin, D., Calvayrac, R., 1989. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research* 24, 185-196.
- Jeyendran, R., Van der Ven, H., Kennedy, W., Perez-Pelaez, M., Zaneveld, L., 1984. Comparison of glycerol and a zwitter ion buffer system as cryoprotective media for human spermatozoa. Effect on motility, penetration of zona-free hamster oocytes, and acrosin/proacrosin. *Journal of Andrology* 5, 1-7.
- Jorgensen, N., Joensen, U.N., Jensen, T.K., Jensen, M.B., Almstrup, K., Olesen, I.A., Juul, A., Andersson, A.M., Carlsen, E., Petersen, J.H., Toppari, J., Skakkebaek, N.E., 2012. Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *BMJ open* 2, 4 e000990.
- Jouannet, P., Wang, C., Eustache, F., Kold-Jensen, T., Auger, J., 2001. Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. *APMIS* 109, S48-S61.
- Kaneko, S., Kobayashi, T., Lee, H., Won, W., Oda, T., Izumi, Y., Ohono, T., Iizuka, R., 1990. Cryogenic preservation of low-quality human semen. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 24, 81-86.
- Kashir, J., Heynen, A., Jones, C., Durrans, C., Craig, J., Gadea, J., Turner, K., Parrington, J., Coward, K., 2011. Effects of cryopreservation and density-gradient washing on phospholipase C zeta concentrations in human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online* 23, 263-267.
- Keel, B., Karow, A., 1980. Motility characteristics of human sperm, nonfrozen and cryopreserved. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 4, 205-212.
- Kemal Duru, N., Morshedi, M., Oehninger, S., 2000. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 74, 1200-1207.

- Keskintepe, L., Pacholczyk, G., Machnicka, A., Norris, K., Curuk, M.A., Khan, I., Brackett, B.G., 2002. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biology of Reproduction* 67, 409-415.
- Kodama, H., Yamaguchi, R., Fukuda, J., Kasai, H., Tanaka, T., 1997. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility* 68, 519-524.
- Kuczyński, W., Dhont, M., Grygoruk, C., Grochowski, D., Wołczyński, S., Szamatowicz, M., 2001. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa—a prospective randomized study. *Human Reproduction* 16, 2109-2113.
- Kusakabe, H., Yanagimachi, R., Kamiguchi, Y., 2008. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Human Reproduction* 23, 233-239.
- Kwon, I.K., Park, K.E., Niwa, K., 2004. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biology of Reproduction* 71, 1430-1436.
- Lasso, J.L., Noiles, E.E., Alvarez, J.G., Storey, B., 1994. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *Journal of Andrology* 15, 255-265.
- Ledger, W.L., 2009. Demographics of infertility. *Reproductive BioMedicine Online* 18, S11-S14.
- Lee, S.J., Schover, L.R., Partridge, A.H., Patrizio, P., Wallace, W.H., Hagerty, K., Beck, L.N., Brennan, L.V., Oktay, K., 2006. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 24, 2917-2931.
- Leibo, S., 1986. Cryobiology: preservation of mammalian embryos. *Basic Life Science* 37, 251-272.
- Leibo, S., Picton, H., Gosden, R., 2002. Cryopreservation of human spermatozoa, in: *Report of a World Health Meeting: Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction.*, WHO Press, Geneva, pp. 152-165.
- Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., Dondero, F., 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update* 2, 246-256.
- Lepage, G., Roy, C., 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *The Journal of Lipid Research* 27, 114-120.
- Li, Z., Lin, Q., Liu, R., Xiao, W., Liu, W., 2010. Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. *Journal of Andrology* 31, 437-444.
- Liu, J.L., Kusakabe, H., Chang, C.C., Suzuki, H., Schmidt, D.W., Julian, M., Pfeffer, R., Bormann, C.L., Tian, X.C., Yanagimachi, R., Yang, X., 2004. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biology of Reproduction* 70, 1776-1781.

- López Teijón, M., García, F., Serra, O., Moragas, M., Rabanal, A., Olivares, R., Alvarez, J., 2007. Semen quality in a population of volunteers from the province of Barcelona. *Reproductive BioMedicine Online* 15, 434-444.
- Luyet, B.J., Hodapp, E.L., 1938. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Experimental Biology and Medicine* 39, 433.
- Macías García, B., González Fernández, L., Ortega Ferrusola, C., Morillo Rodríguez, A., Gallardo Bolaños, J., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J., Morcuende, D., Peña, F., 2011. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 75, 811-818.
- Madrid-Bury, N., Pérez-Gutiérrez, J., Pérez-Garnelo, S., Moreira, P., Sanjuanbenito, B., Gutiérrez-Adán, A., Martínez, J., 2005. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology* 64, 232-241.
- Mahadevan, M., Trounson, A., 1984. Effect of cooling, freezing and thawing rates and storage conditions on preservation of human spermatozoa. *Andrologia* 16, 52-60.
- Mahfouz, R., Sharma, R., Sharma, D., Sabanegh, E., Agarwal, A., 2009. Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertility and Sterility* 91, 805-811.
- Mantegazza, P., 1886. *Fisiologia Sul Sperma Immano*. *Rendiconto Reale. Istituto Lombarda* 4, 183.
- Martinez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Alvarez-Rodriguez, M., Alvarez, M., Anel, L., de Paz, P., 2010. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction in Domestic Animals* 45 Suppl 2, 67-78.
- Martinez-Soto, J., Hourcade, J., Gutiérrez-Adán, A., Landeras, J., Gadea, J., 2010. Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology* 12, 431-441.
- Martínez-Soto, J.C., García-Vazquez, F.A., Gumbao, D., Landeras, J., Gadea, J., 2011. Assessment of two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellets. *Cryobiology* 63, 131-136.
- Martínez-Soto, J.C., Landeras, J., Gadea, J., 2012. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*. DOI:10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x
- Maxwell, W., Landers, A., Evans, G., 1995. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology* 43, 1201-1210.
- Mazur, P., 1966. Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing., In: Meryman, H.T. (Ed.), *Cryobiology*, London, pp. 213-215.
- Mazur, P., 1970. *Cryobiology: The freezing of biological systems*. *Science* 168, 939-949.
- Mazur, P., 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14, 251-272.

- Mazur, P., 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal Physiology* 247, 125-142.
- Mazzilli, F., Rossi, T., Sabatini, L., Pulcinelli, F., Rapone, S., Dondero, F., Gazzaniga, P., 1995. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Europaea Fertilitatis* 26, 145-148.
- McGonagle, L., Goldstein, M., Feldschuh, J., Foote, R., 2002. The influence of cryoprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen-thawed human sperm. *Asian Journal of Andrology* 4, 137-142.
- McGrady, A., 1984. Effects of psychological stress on male reproduction: a review. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 13, 1-7.
- McLaughlin, E., Ford, W., Hull, M., 1992. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. *Reproduction* 95, 749-754.
- Menzel, V., Hirsch, E., Hägele, W., Hirsch, K., 2007. Effect of genistein on acrosome reaction and zona pellucida binding independent of protein tyrosine kinase inhibition in bull. *Asian Journal of Andrology* 9, 650-658.
- Merzenich, H., Zeeb, H., Blettner, M., 2010. Decreasing sperm quality: a global problem? *BMC Public Health* 10, 24.
- Meseguer, M., Garrido, N., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J., 2004. Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Journal of Andrology*. 25, 773-780.
- Meseguer, M., Molina, N., García-Velasco, J.A., Remohí, J., Pellicer, A., Garrido, N., 2006. Sperm cryopreservation in oncological patients: a 14-year follow-up study. *Fertility and Sterility* 85, 640-645.
- Miller, R., Cornett, C., Waterhouse, K., Farstad, W., 2005. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation. *Cryobiology* 51, 66-75.
- Mohammad, S., Barratt, C., Cooke, I., Moore, H., 1997. Continuous assessment of human spermatozoa viability during cryopreservation. *Journal of Andrology* 18, 43-50.
- Morris, G., 2006. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Human Reproduction* 21, 2075-2083.
- Morris, G., Acton, E., Avery, S., 1999. A novel approach to sperm cryopreservation. *Human Reproduction* 14, 1013-1021.
- Morris, G., Acton, E., Murray, B., Fonseca, F., 2012. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology* 64, 71-80.

- Mortimer, D., 2004. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reproductive Biomedicine Online* 9, 134-151.
- Moubasher, A.E., El Din, A.M.E., Ali, M.E., El-sherif, W.T., Gaber, H.D., 2013. Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Andrologia* 45, 135-139.
- Nagase, H., Niwa, T., 1964. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. *International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, pp. 410-415.
- Nallella, K.P., Sharma, R.K., Allamaneni, S.S.R., Aziz, N., Agarwal, A., 2004. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertility and Sterility* 82, 913-918.
- Nijs, M., Ombelet, W., 2001. Cryopreservation of human sperm. *Human Fertility* 4, 158-163.
- Nissen, H.P., Kreysel, H.W., 1983. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. *Andrologia* 15, 264-269.
- Nygren, K., 2005. Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 20, 1158-1176.
- O'Connell, M., McClure, N., Lewis, S., 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction* 17, 704-709.
- Oehninger, S., Duru, N.K., Srisombut, C., Morshedi, M., 2000. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 169, 3-10.
- Oliva, A., Spira, A., Multigner, L., 2001. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reproduction* 16, 1768-76.
- Ombelet, W., Cooke, I., Dyer, S., Serour, G., Devroey, P., 2008. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Human Reproduction Update* 14, 605-621.
- Ozkavukcu, S., Erdemli, E., Isik, A., Oztuna, D., Karahuseyinoglu, S., 2008. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 25, 403-411.
- Paasch, U., Sharma, R.K., Gupta, A.K., Grunewald, S., Mascha, E.J., Thomas, A.J., Glander, H.J., Agarwal, A., 2004. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biology of Reproduction* 71, 1828-1837.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A.C., 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet* 340, 17-18.
- Parks, J., Graham, J., 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38, 209-222.
- Parrington, J., Davis, L.C., Galione, A., Wessel, G., 2007. Flipping the switch: how a sperm activates the egg at fertilization. *Developmental Dynamics* 236, 2027-2038.

- Pasqualotto, F.F., Lucon, A.M., Sobreiro, B.P., Pasqualotto, E.B., Arap, S., 2004. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Revista do Hospital das Clínicas* 59, 375-382.
- Perloff, W., Steinberger, E., Sherman, J., 1964. Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor technic. *Fertility and Sterility* 15, 501-504.
- Polge, C., Rowson, L., 1952. Results with bull semen stored at -79 C. *Veterinary Record* 4, 851-853.
- Polge, C., Smith, A., Parkes, A., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164, 666.
- Poulos, A., White, I., 1973. The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility* 35, 265-272.
- Ragni, G., Caccamo, A., Dalla Serra, A., Guercilena, S., 1990. Computerized slow-staged freezing of semen from men with testicular tumors or Hodgkin's disease preserves sperm better than standard vapor freezing. *Fertility and Sterility* 53, 1072-1075.
- Ranganathan, P., Mahran, A., Hallak, J., Agarwal, A., 2002. Sperm cryopreservation for men with nonmalignant, systemic diseases: a descriptive study. *Journal of Andrology*. 23, 71-75.
- Richter, M., Haning Jr, R., Shapiro, S., 1984. Artificial donor insemination: fresh versus frozen semen; the patient as her own control. *Fertility and Sterility* 41, 277-280.
- Rossi, T., Mazzilli, F., Delfino, M., Dondero, F., 2001. Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. *Cell and Tissue Banking* 2, 9-13.
- Rowe, P.J., Comhaire, F.H., 2000. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge University Press.
- Royere, D., Barthelemy, C., Hamamah, S., Lansac, J., 1996. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Human Reproduction Update* 2, 553-559.
- Royere, D., Hamamah, S., Nicolle, J., Barthelemy, C., Lansac, J., 1988. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: Fluorescence acridine orange staining and Feulgen DNA cytophotometric studies. *Gamete Research* 21, 51-57.
- Saleh, R.A., Agarwal, A., Sharma, R.K., Nelson, D.R., Thomas, A.J., 2002. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility* 78, 491-499.
- Salisbury, G., Fuller, H., Willett, E., 1941. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. *Journal of Dairy Science* 24, 905-910.
- Sanocka, D., Miesel, R., Jedrzejczak, P., Kurpisz, M., 1996. Oxidative stress and male infertility. *Journal of Andrology* 17, 449.



- Sant, M., Aareleid, T., Artioli, M.E., Berrino, F., Coebergh, J.W., Colonna, M., Forman, D., Hedèlin, G., Rachtan, J., Lutz, J.M., 2007. Ten-year survival and risk of relapse for testicular cancer: a EURO CARE high resolution study. *European Journal of Cancer* 43, 585-592.
- Schiller, J., Arnhold, J., Glander, H.J., Arnold, K., 2000. Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy—effects of freezing and thawing. *Chemistry and Physics of Lipids* 106, 145-156.
- Schrader, M., Müller, M., Straub, B., Miller, K., 2001. The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic basis and clinical aspects. *Reproductive Toxicology* 15, 611-617.
- Seibel, M.M., Taymor, M.L., 1982. Emotional aspects of infertility. *Fertility and Sterility* 37, 137-145.
- Serafini, P., Marrs, R., 1986. Computerized staged-freezing technique improves sperm survival and preserves penetration of zona-free hamster ova. *Fertility and Sterility* 45, 854-858.
- Sharma, V., 2011. Sperm storage for cancer patients in the UK: a review of current practice. *Human Reproduction* 26, 2935-2943.
- Sharpe, R.M., Irvine, D.S., 2004. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* 328, 447-451.
- Sherman, J., 1963. Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying. *Fertility and Sterility* 14, 49-54.
- Sherman, J., 1973. Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. *Fertility and Sterility*. 24, 397-412.
- Sherman, J., 1990. Cryopreservation of human semen. *CRC Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. Edited by BA Keel and BW Webster. Boston: CRC Press, Inc., chapt 13, 229.
- Shettles, L., 1940. The respiration of human spermatozoa and their response to various cases and low temperature. *American Journal Physiology* 128, 408-415.
- Silva, P., Gadella, B., 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958-978.
- Sinclair, S., 2000. Male infertility: nutritional and environmental considerations. *Alternative medicine review* 5, 28-38.
- Singer, S., Nicholson, G., 1972. The fluid mosaic model of structure of cell mebranes. *Science* 175, 720-731.
- Spallanzani, 1776. *Observazioni e sperienze intorno ai vercimelli spermatici dell'hommo deglianimali. Opuscoli di Fisica Animali e Vegetabile. II.*
- Stanic, P., Sonicki, Z., Suchanek, E., 2002. Effect of pentoxifylline on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *International Journal of Andrology* 25, 186-190.

- Stanic, P., Tandara, M., Sonicki, Z., Simunic, V., Radakovic, B., Suchanek, E., 2000. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 91, 65-70.
- Swain, J.E., Miller Jr, R.R., 2000. A postcryogenic comparison of membrane fatty acids of elephant spermatozoa. *Zoo Biology* 19, 461-473.
- Tavilani, H., Doosti, M., Abdi, K., Vaisiraygani, A., Joshaghani, H.R., 2006. Decreased polyunsaturated and increased saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. *Andrologia* 38, 173-178.
- Taylor, K., Roberts, P., Sanders, K., Burton, P., 2009. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online* 18, 184-189.
- Thachil, J.V., Jewett, M., 1981. Preservation techniques for human semen. *Fertility and Sterility* 35, 546-548.
- Thomson, L., Fleming, S., Aitken, R., De Iuliis, G., Zieschang, J.A., Clark, A., 2009. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction* 24, 2061-2070.
- Thomson, L.K., Fleming, S.D., Barone, K., Zieschang, J.A., Clark, A.M., 2010. The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility* 93, 1147-1156.
- Thurston, L.M., Siggins, K., Mileham, A.J., Watson, P.F., Holt, W.V., 2002. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biology of Reproduction* 66, 545-554.
- Thurston, L.M., Watson, P.F., Mileham, A.J., Holt, W.V., 2001. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *Journal of Andrology* 22, 382.
- Tournaye, H., Merdad, T., Silber, S., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P., Van Steirteghem, A., 1999. No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Human Reproduction* 14, 90-95.
- Van Steirteghem, A., Nagy, P., Joris, H., Janssenswillen, C., Staessen, C., Verheyen, G., Camus, M., Tournaye, H., Devroey, P., 1998. Results of intracytoplasmic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa. *Human Reproduction* 13 Suppl 1, 134-142.
- Varghese, A.C., Das, S., Bhattacharya, A.K., Bhattacharya, S.M., Mandal, M., Agarwal, A., 2005. Effect of cryoprotective additives-reduced glutathione, acetyl-L-carnitine on sperm membrane lipid peroxidation, DNA integrity and recovery of motile human sperm. *Fertility and Sterility*. 84, S410-S411.

- Verheyen, G., Pletincx, I., Van Steirteghem, A., 1993. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Human reproduction* 8, 1678-1684.
- Verza Jr, S., Esteves, S.C., 2004. Feasibility of refreezing human spermatozoa through the technique of liquid nitrogen vapor. *International Braz J Urol* 30, 487-493.
- Wakayama, T., Yanagimachi, R., 1998. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nature Biotechnology* 16, 639-641.
- Wang, A.W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D.J., Loughlin, K.R., 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49, 921-925.
- Wang, X., Sharma, R.K., Sikka, S.C., Thomas, A.J., Falcone, T., Agarwal, A., 2003. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertility and Sterility* 80, 531-535.
- Waterhouse, K., Hofmo, P., Tverdal, A., Miller, R., 2006. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction* 131, 887-894.
- Watson, P., 1979. The preservation of semen in mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Clarendon Press. Oxford. pp 283-350.
- Watson, P., 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development* 7, 871-891.
- Weidel, L., Prins, G., 1987. Cryosurvival of human spermatozoa frozen in eight different buffer systems. *Journal of Andrology* 8, 41-47.
- White, I., 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development* 5, 639-658.
- Williams, D.H., 2010. Sperm banking and the cancer patient. *Therapeutic Advances in Urology* 2, 19-34.
- Wong, W.Y., Thomas, C.M.G., Merkus, J.M.W.M., Zielhuis, G.A., Steegers-Theunissen, R.P.M., 2000. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertility and Sterility* 73, 435-442.
- Wood, S., Vang, E., Troup, S., Kingsland, C., Lewis-Jones, D., 2002. Surgical sperm retrieval after previous vasectomy and failed reversal: clinical implications for in vitro fertilization. *BJU international* 90, 277-281.
- Woolley, D., Richardson, D., 1978. Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *Journal of Reproduction and Fertility* 53, 389-394.
- Wünderlich, K., Paasch, U., Leicht, M., Glander, H.J., 2006. Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation—an immunoblot study. *Cell and Tissue Banking* 7, 81-90.

- Zalata, A., Christophe, A., Depuydt, C., Schoonjans, F., Comhaire, F., 1998. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Molecular Human Reproduction* 4, 111-118.
- Zini, A., 2011. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Systems Biology in Reproductive Medicine* 57, 78-85.
- Zribi, N., Feki Chakroun, N., El Euch, H., Gargouri, J., Bahloul, A., Ammar Keskes, L., 2010. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and Sterility* 93, 159-166.



## **4. Anexos**

## Abreviaturas

**8OHdG:** 8-hydroxydeoxyguanosine (8 hidroxí desoxiguanosina)

**AA:** Arachidic acid (ácido araquídico)

**ABTS:** 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ALA:** Linolenic acid (ácido linolénico)

**ALH:** Amplitud lateral de desplazamiento de cabeza

**ARA:** Árachidonic acid (ácido araquidónico)

**BCF:** Beat cross frequency (frecuencia de batido de cola)

**CASA:** Computer-Assisted Sperm Analysis (Análisis computerizado de esperma)

**DCFA:** Diacetato de carboxifluoresceína

**DGLA:** Dihomo-gamma-linolenic acid (ácido dihomo-gamma-linolénico)

**DHA:** Docosahexaenoic acid (ácido docosahexaenoico)

**DMSO:** Dimetilsulfoxido

**DPA:** Docosapentaenoic acid (ácido docosapentaenoico)

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiamino tetraacético)

**EPA:** Eicosapentaenoic acid (ácido eicosapentaenoico)

**ETE:** Eicosatrienoic acid (ácido eicosatrienoico)

**GRD:** Glutathion reductasa

**GSH:** Glutathión reducido

**GSSG:** Glutathion oxidado

**H<sub>2</sub>DCFDA:** Diacetato de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína

**HPLC:** High-performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)

**HSA:** Human serum albumin (Suero de albumina humana)

**HTF:** Human tubal fluid (fluido tubal humano)

**IAD:** Inseminación artificial con semen de donante

**ICSI:** Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

**IUI:** Inseminación intrauterina

**IVI:** Instituto Valenciano de Infertilidad

**LA:** Linoleic acid (ácido Linoleico)

**LIN:** Linearity of the curvilinear trajectory (Linearidad de la trayectoria curvilinear)

**M:** molar

**M540:** Merocianina 540

**MUFA:** Ácido graso monoinsaturado

**PBS:** Phosphate buffered saline (tampón fosfato salino)

**PI:** Propidium iodide (Ioduro de Propidio)

**PP:** Polipropileno

**PROH:** Propanodiol

**PTEG:** politereftalato de etileno

**PUFA:** Ácidos grasos poliinsaturados

**ROS: Reactive oxygen species** (Especies oxígeno reactivas)

**SEM:** Error estandar de la media

**SFA:** Ácido graso saturado

**SOD:** Superóxido dismutase

**TAC:** Total antioxidant capacity (Capacidad antioxidante total)

**TES:** (ácido n-tris (hidroximetil) metil 2 amino etanosulfónico) 2- [ [1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl]amino]ethanesulfonic acid

**TESE:** Testicular sperm extraction (extracción de espermatozoides testiculares)

**TRA:** Tratamiento de reproducción asistida

**TRIS:** (hidroximetil) amino metano 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

**VAP:** Average path velocity (Media de velocidad)



**VCL:** Curvilinear velocity (Velocidad curvilínea)

**VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana

**VSL:** Straight-line velocity (Velocidad en línea recta)

**WOB:** Wobble of the curvilinear trajectory (oscilamiento de la trayectoria curvilínea)

**ZP:** Zona Pelúcida

**$\omega 3$ :** Ácido graso omega 3

**$\omega 6$ :** Ácido graso omega 6

## **Trabajos publicados**

**Juan Carlos Martínez Soto, con DNI nº 22.959.834-S** estudiante de doctorado del programa (09501) Biología de la Reproducción en los mamíferos, con Mención de Calidad del MEC curso 2004/2005 y autor de los artículos que a continuación se relacionan

- **Martínez-Soto JC**, Hourcade JD, Gutiérrez-Adán A, Landeras JL, Gadea J. Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. *Asian J Androl.* 2010 May;12(3):431-41.
- **Martínez-Soto JC**, García-Vazquez FA, Gumbao D, Landeras J, Gadea J. Assessment of two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellets. *Cryobiology.* 2011 Dec;63(3):131-6.
- **Martínez-Soto JC**, Landeras J, Gadea J. Sperm and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology.* Aceptado 11 octubre de 2012.

Declara que ha participado activamente en el diseño de los tres estudios, en el desarrollo del proceso experimental, en la evaluación y la discusión de los resultados bajo la dirección científica de mi director de tesis el Dr. Joaquín Gadea Mateos.

Murcia, a 15 de marzo de 2013

**Record 1 of 1****Title:** Assessment of two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellets**Author(s):** Martinez-Soto JC (Carlos Martinez-Soto, Juan); Garcia-Vazquez FA (Garcia-Vazquez, Francisco A.); Gumbao D (Gumbao, David); Landeras J (Landeras, Jose); Gadea J (Gadea, Joaquin)**Source:** CRYOBIOLOGY **Volume:** 63 **Issue:** 3 **Pages:** 131-136 **DOI:** 10.1016/j.cryobiol.2011.08.001 **Published:** DEC 2011**Times Cited in Web of Science:** 1**Total Times Cited:** 1**Cited Reference Count:** 62

**Abstract:** In this study, we evaluated the effects of the thawing methodology on sperm function after cryopreservation in pellets. We compared the use of two thawing procedures: method (1) maintaining pellet for 10 min in air at room temperature, then another 10-min period in air at 37 degrees C followed by dilution in a thawing medium; and method (2) immersing the pellets directly in thawing medium at 37 degrees C for 20 min. This procedure leads to a higher rate of temperature increase and a dilution of the glycerol present in the freezing medium. We analyzed the effect of the thawing procedure on sperm motility, viability, membrane lipid packing disorder, acrosome status, reactive oxygen species (ROS) level and sperm chromatin condensation. This study revealed a positive effect of the M2 thawing methodology on sperm parameters. The percentage of spermatozoa with fast-linear movement is increased (M1: 17.26% vs. M2: 28.05%,  $p < 0.01$ ). with higher viability (M1: 37.81% vs. M2: 40.15%,  $p < 0.01$ ) and less acrosome damage (M1: 40.44% vs. M2: 35.45%,  $p = 0.02$ ). We also detected an increase in the percentage of viable spermatozoa with low membrane lipid disorder (M1: 31.36% vs. M2: 33.17%,  $p = 0.03$ ) and a reduction in chromatin condensation (44.62 vs. 46.62 arbitrary units,  $p = 0.02$ ). Further studies will be necessary to evaluate the possible clinical applications. (C) 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Accession Number:** WOS:000297907800002**Language:** English**Document Type:** Article**Author Keywords:** Cryopreservation; Thawing; Sperm motility; Sperm membrane; Spermatozoa; Acrosome reaction; Oxidative stress**Key Words Plus:** GLUTATHIONE IMPROVES FUNCTION; VITRO FERTILIZING ABILITY; FLOW-CYTOMETRIC ANALYSIS; HUMAN-SPERMATOZOA; LIPID-PEROXIDATION; IN-VITRO; MITOCHONDRIAL-FUNCTION; CRYOPROTECTIVE MEDIA; REPRODUCTIVE-BIOLOGY; CHROMATIN STABILITY**Addresses:** [Carlos Martinez-Soto, Juan; Garcia-Vazquez, Francisco A.; Gumbao, David; Gadea, Joaquin] Univ Murcia, Dept Physiol, Sch Vet Sci, E-30100 Murcia, Spain.

[Carlos Martinez-Soto, Juan; Gumbao, David; Landeras, Jose] IVI Murcia, Murcia 30007, Spain.

**Reprint Address:** Gadea, J (reprint author), Univ Murcia, Dept Physiol, Sch Vet Sci, E-30100 Murcia, Spain.**E-mail Address:** jgadea@um.es**ResearcherID Numbers:**

GADEA, JOAQUIN	C-9731-2009
----------------	-------------

**Publisher:** ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE**Publisher Address:** 525 B ST, STE 1900, SAN DIEGO, CA 92101-4495 USA**Web of Science Categories:** Biology; Physiology**Research Areas:** Life Sciences & Biomedicine - Other Topics; Physiology**IDS Number:** 859WZ**ISSN:** 0011-2240**29-char Source Abbrev.:** CRYOBIOLOGY**ISO Source Abbrev.:** Cryobiology**Source Item Page Count:** 6**Funding:**

Funding Agency	Grant Number
University of Murcia, Spain	

This work was supported by University of Murcia, Spain.

**Record 1 of 1****Title:** Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa**Author(s):** Martinez-Soto JC (Carlos Martinez-Soto, Juan); de DiosHourcade J (de DiosHourcade, Juan); Gutierrez-Adan A (Gutierrez-Adan, Alfonso); Landeras JL (Lorenzo Landeras, Jose); Gadea J (Gadea, Joaquin)**Source:** ASIAN JOURNAL OF ANDROLOGY **Volume:** 12 **Issue:** 3 **Pages:** 431-441 **DOI:** 10.1038/aja.2009.92 **Published:** MAY 2010**Times Cited in Web of Science:** 9**Total Times Cited:** 10**Cited Reference Count:** 56

**Abstract:** In this study, we evaluated the effects of genistein supplementation of the thawing extender on frozen-thawed human semen parameters. We analyzed the effect of supplementation on sperm motility, capacitation (membrane lipid disorder), reactive oxygen species (ROS) generation, chromatin condensation and DNA damage. Using this preliminary information, it maybe possible to improve the cryopreservation process and reduce the cellular damage. We have confirmed that the isoflavone genistein (10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) has antioxidant properties on the frozen-thawed spermatozoa. This results in a decreased ROS production that shows a slight improvement in the sperm motility, and decreases the membrane lipid disorder and DNA damage caused by cryopreservation. These results suggest an effect of genistein on sperm functionality that could be of interest for assisted reproduction treatments using frozen-thawed human spermatozoa, but further studies will be necessary to confirm our findings and to evaluate the possible clinical applications.

**Accession Number:** WOS:000277249900017**Language:** English**Document Type:** Article**Author Keywords:** antioxidants; cryopreservation; DNA damage; genistein; isoflavones; sperm motility**KeyWords Plus:** INTRACITOPLASMIC SPERM INJECTION; GLUTATHIONE IMPROVES FUNCTION; VITRO FERTILIZING ABILITY; PROTEIN-TYROSINE KINASE; DNA-DAMAGE; REDUCED GLUTATHIONE; OXIDATIVE STRESS; COMET ASSAY; CHROMATIN CONDENSATION; SUBLETHAL CRYODAMAGE**Addresses:** [Carlos Martinez-Soto, Juan; Gadea, Joaquin] Univ Murcia, Sch Vet, Dept Physiol, E-30100 Murcia, Spain.

[Carlos Martinez-Soto, Juan; Lorenzo Landeras, Jose] IVI MURCIA, Murcia 30007, Spain.

[de DiosHourcade, Juan; Gutierrez-Adan, Alfonso] INIA, Dept Anim Reprod, Madrid 28040, Spain.

**Reprint Address:** Gadea, J (reprint author), Univ Murcia, Sch Vet, Dept Physiol, E-30100 Murcia, Spain.**E-mail Address:** jgadea@um.es**ResearcherID Numbers:**

GADEA, JOAQUIN | C-9731-2009

**Publisher:** SHANGHAI INST MATERIA MEDICA**Publisher Address:** 555 ZU CHONG ZHI RD, ZHANG JIANG HI-TECH PARK, SHANGHAI, PUDONG 201203, PEOPLES R CHINA**Web of Science Categories:** Andrology; Urology & Nephrology**Research Areas:** Endocrinology & Metabolism; Urology & Nephrology**IDS Number:** 590TC**ISSN:** 1008-682X**29-char Source Abbrev.:** ASIAN J ANDROL**ISO Source Abbrev.:** Asian J. Androl.**Source Item Page Count:** 11

Find your next career at **Johnson & Johnson**



WILEY Job Network

Apply today! ▶

Original Article

# Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success

1. J. C. Martínez-Soto<sup>1,2</sup>,
2. J. Landeras<sup>2</sup>,
3. J. Gadea<sup>1,\*</sup>

Article first published online: 29 NOV 2012

DOI: 10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x

© 2012 American Society of Andrology and European Academy of Andrology

Issue



## Andrology

[Early View \(Online Version of Record published before inclusion in an issue\) \(/journal/10.1111/\(ISSN\)2047-2927/earlyview\)](#)

Additional Information

### How to Cite

Martínez-Soto, J. C., Landeras, J. and Gadea, J. (2012), Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*. doi: 10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x

### Author Information

- 1 Department of Physiology, School of Veterinary Sciences, University of Murcia, Murcia, Spain
- 2 Department of Physiology, School of Veterinary Sciences, IVI Murcia, Murcia, Spain

\*Correspondence: Joaquín Gadea, Department of Physiology, School of Veterinary Medicine, University of Murcia, Campus Mare Nostrum, Murcia 30 100, Spain. E-mail: [jgadea@um.es](mailto:jgadea@um.es) (<mailto:jgadea@um.es>)

### Publication History

1. Article first published online: 29 NOV 2012
2. Manuscript Accepted: 11 OCT 2012
3. Manuscript Revised: 28 SEP 2012
4. Manuscript Received: 22 JUN 2012

## Funded by

- IVI Murcia and University of Murcia
- Abstract
- [Article \(/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/full\)](/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/full)
- [References \(/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/references\)](/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/references)
- [Cited By \(/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/citedby\)](/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/citedby)

[View Full Article \(HTML\) \(/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/full\)](/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/full) [Get PDF \(147K\) \(/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/pdf\)](/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/pdf)

## Keywords:

cryopreservation; fatty acid; lipids; seminal plasma; sperm motility; spermatozoa

## Summary

There is a lack of information about the importance of fatty acid composition of the human sperm membranes and seminal plasma in the cryopreservation procedure. Our aims were to study the possible relationships between the fatty acid composition of human spermatozoa or seminal fluid before freezing, and the sperm quality, measured in terms of viability and motility, before and after freezing–thawing. A further objective of this study was to determine whether the antioxidant capacity (TAC) of the seminal plasma is related to fatty acid (FA) composition and to success of the cryopreservation process. Polyunsaturated fatty acids (PUFA),  $\omega$ 3 PUFAs and docosahexaenoic acid (DHA) in spermatozoa were significantly positively correlated with sperm viability and motility parameters before and after freezing. An inverse relationship was found for monounsaturated (MUFA), ratio  $\omega$ 6/ $\omega$ 3, ratio saturated fatty acids/PUFA (SFA/PUFA) with the seminal parameters. Seminal plasma fatty acid composition was not related to viability. However, motility parameters before and after freezing were related to stearic acid (C18:0) and DHA. TAC in seminal plasma was directly related to PUFA,  $\omega$ 3 and DHA. On the other hand, SFA, C22:0, C24:0 and MUFA in seminal plasma were inversely related to the antioxidant capacity. TAC was directly correlated with motion parameters after thawing.

We described a significant correlation between the fatty acid composition of the human spermatozoa or seminal plasma and the sperm parameters of the samples after thawing. PUFA,  $\omega$ 3 and specially DHA are directly correlated with sperm motility and viability after freezing/thawing, and MUFA was inversely correlated. This means that in the future the fatty acid composition could be used as a predictor of the capacity of cryopreservation. On the other hand, we could design further procedures to modify the lipid composition or/and antioxidant capacity of ejaculate to make it more resistant to the cryopreservation process.

[View Full Article \(HTML\) \(/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/full\)](/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/full) [Get PDF \(147K\) \(/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/pdf\)](/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x/pdf)

## More content like this

Find more content: