

EFECTO DE LOS PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA FERTILIDAD SEMINAL

MC Stornelli¹, CM Tittarelli², CA Savignone³, MA Stornelli¹

¹Cátedra de Reproducción Animal. ²Cátedra de Fisiología. ³Cátedra de Histología.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

Resumen: La fertilidad del semen criopreservado es inferior a la del semen fresco. Este hecho está relacionado con los daños subletales instaurados en la población espermática que sobrevive al proceso de congelación. Diversos factores (shock de frío, velocidad de enfriamiento, composición de los diluyentes y estrés osmótico) que ocurren durante el proceso de congelación, son responsables de la disminución de la fertilidad en el semen congelado. En este trabajo se discuten los factores que afectan la calidad de los espermatozoides sobrevivientes al proceso de criopreservación.

Palabras claves: semen, criopreservación, fertilidad.

CRIOPRESERVATION EFFECT ON FERTILITY

ABSTRACT: Cryopreserved semen has impaired fertility compare to fresh semen. The lower post-thaw viability and fertility is related with the spermatozoa sub lethal dysfunction establishes in part of the survival population. These facts are relations with many factors (e.g. cold shock, cooling rate, extender composition, and osmotic stress) during the cryopreservation process. In this paper factor affecting the quality or survival spermatozoa are reviewed.

KEY WORDS: semen, cryopreservation, fertility.

Fecha de recepción: 27/01/05

Fecha de aprobación: 16/08/05

Dirección para correspondencia: Alejandra Stornelli, Cátedra de Reproducción. Facultad de Ciencias Veterinaria. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: astornel@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen y la utilización del semen congelado mediante inseminación artificial ha causado un gran impacto sobre la reproducción animal y humana. Innumerables crías de diferentes especies han nacido a partir del uso de semen congelado. Sin embargo constantemente se modifican los protocolos de congelación a fin de obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelado. Para lograr estos objetivos es necesario comprender a que tipo de estrés se ven sometidos los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación así como la manera en que las células responden a las agresiones fisicoquímicas medioambientales.

Mediante la criopreservación es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil (1). Crister (2) observó que los espermatozoides descongelados móviles, con membranas intactas no mantenían su viabilidad y capacidad fecundante durante tanto tiempo como los espermatozoides del semen fresco. Estas observaciones se relacionan con los cambios semejantes a la capacitación, inducidos por los procesos de congelación en la célula espermática. Durante la congelación y descongelación se producen alteraciones celulares que causan reducción de la fertilidad del semen criopreservado en comparación con el semen fresco. Esta reducción de la fertilidad se relaciona tanto con la muerte de las células que no soportan la injuria del proceso de congelación y descongelación, como con la disfunción no letal instaurada en una parte de la población sobreviviente. (3). Un aumento de las tasas de concepción puede lograrse mejorando los métodos de criopreservación tratando de prevenir o minimizar la ocurrencia de los eventos que desestabilizan las membranas y mejorando la calidad de los espermatozoides sobrevivientes (1, 3).

Diversos factores están implicados en la bajas tasas de concepción logradas mediante el uso de semen congelado en comparación con el semen fresco. Un factor de suma importancia es la calidad de semen obtenida al descongelado. Múltiples factores afectan la sobrevivencia de los espermatozoides al descongelado: la metodología de congelación y descongelación, la concentración espermática en el diluyente, el envasado, la composición del diluyente empleado.

Durante el proceso de congelación-descongelación se pierde aproximadamente el 50% de la población inicial de espermatozoides debido a los efectos de la criopreservación sobre las membranas, citoesqueleto, aparato motor y núcleo del espermatozoide (1, 4, 5). Se considera que el principal sitio de daño asociado a los cambios de temperatura son las membranas espermáticas (1). La reducción de la fertilidad asociada al semen congelado es atribuida en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación (4, 6). Para poder interactuar con el oocito, los espermatozoides deben estar vivos, móviles y poseer la membrana plasmática y acrosomal intactas y funcionales.

La pérdida espermática ocurrida durante la criopreservación puede compensarse en parte mediante la inseminación artificial (IA) de un gran número de espermatozoides, o mediante la colocación del semen en la porción craneal del tracto reproductivo. En el primer caso, al colocar un número mayor de espermatozoides totales contaríamos con un mayor número de espermatozoides que han sobrevivido viables luego de soportar las injurias ocurridas durante la congelación-descongelación (6). Así mismo si no aumentamos la dosis inseminante pero colocamos mediante IA quirúrgica el semen en la porción proximal del tracto reproductivo podremos lograr un aumento de la fertilidad. Esta mejora de la fertilidad puede entenderse si recordamos los eventos necesarios para la fecundación. Debe haber un número suficiente de espermatozoides competentes capaces de realizar la fertilización en el período de tiempo en el cual existen óvulos fértiles capaces de ser fecundados. El isthmus del oviducto actúa como un reservorio funcional de espermatozoides brindando una fuente de potenciales espermatozoides fertilizadores durante este período (7). Sólo una pequeña parte de los espermatozoides depositados en el tracto genital distal de la hembra llega al reservorio oviductal, la mayoría es expulsado a través de la vulva o fagocitado en el aparato genital femenino. En la ampolla oviductal, en el momento de la fertilización, el radio espermatozoide-oocito es aproximadamente 1(8). La competencia numérica y temporal de estos espermatozoides depende tanto del número como de la calidad de espermatozoides introducidos en el tracto genital distal. Cuando la calidad o el número de espermatozoides inseminados no es óptima, la disponibilidad de espermatozoides poten-

cialmente fértiles es escasa y la fertilidad se ve reducida (9, 10).

Si el número total de espermatozoides funcionales en una IA con semen congelado cae por debajo del número necesario para lograr una alta probabilidad de fertilización, entonces la fertilidad se ve afectada. Cuando la IA es realizada en la región proximal del tracto genital se requieren pocos espermatozoides para lograr altas probabilidades de fertilidad ya que muchos sobrevivirán para alcanzar el oviducto. Este hecho fue evidenciado por Maxwell (11) quien demostró que solo 20×10^6 espermatozoides móviles criopreservados son necesarios para lograr un porcentaje de fertilidad mayor al 50% realizando IA intrauterina en ovejas mientras que se necesita una dosis muy superior al utilizar la IA cervical. Si la IA fue hecha dentro del oviducto se requieren menos de 1×10^6 espermatozoides (12).

Un factor importante a considerar es la diferente sensibilidad a los procesos de congelación que poseen los espermatozoides de diferentes machos (13, 14). Muchos estudios experimentales se han realizado utilizando un pool de semen de varios machos, en estos trabajos quedan enmascaradas las diferencias individuales (15, 16, 17). Estas diferencias son un factor importante en la elección del protocolo de congelación seleccionado para obtener buenos resultados a la descongelación.

La optimización del protocolo de congelación debe contemplar no solo la obtención de un alto número de espermatozoides sobrevivientes sino también la habilidad funcional de esta población.

FACTORES QUE AFECTAN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN

Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos de volumen. El primer cambio de volumen ocurre cuando la célula es colocada dentro de un diluyente, el cual contiene sustancias crioprotectoras como glicerol, y posteriormente cuando la solución es congelada. Mas tarde ocurren cambios de volumen cuando la solución es descongelada. Estos cambios de volumen están asociados a cambios de la concentración de iones y electrólitos en las soluciones intra y extra celular. La forma en que ocurren estas modificaciones determinan la mayor o menor capacidad de la célula para soportar la

injurias a la que se ve sometida. Los cambios de volumen son solo uno de los factores de estrés a los que la célula se ve sometida durante el proceso de criopreservación. Otros factores de estrés están representados por los cambios de temperatura, el estrés tóxico producido por la exposición a crioprotectores, la formación y disolución de hielo así como los cambios de osmolalidad en el ambiente extracelular (18).

Shock de frío

Es bien conocido que el enfriamiento rápido del semen entre $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ induce un estrés letal en algunas células, el cual es proporcional a la tasa de enfriamiento. Es así que el enfriamiento en este rango de temperaturas debe ser realizado cuidadosamente (1, 19). Este fenómeno es conocido como shock de frío y puede apreciarse durante el enfriamiento de espermatozoides de cualquier especie. En el porcino este fenómeno se manifiesta inmediatamente después de la eyaculación haciéndose las células cada vez menos sensibles al mismo en las horas siguientes (20).

Sin embargo, un lento enfriamiento induce estrés sobre la membrana del espermatozoide. Este hecho se relacionaría con un cambio de fase lipídica y alteraría el estado funcional de la membrana. Este fenómeno se relacionaría en parte con el efecto crioprotector observado al agregar trealosa al diluyente utilizado para congelación, ya que la trealosa posee la propiedad de interaccionar con los lípidos de membrana (21), aumentando su estabilidad y limitando la fase de transición (22), ejerciendo así un efecto estabilizador de la membrana, lo cual explicaría su acción crioprotectora (23). El shock de frío es visto como el estado extremo de un stress continuo influenciado por la velocidad con que este fenómeno se inicia. (24).

El hecho de que el shock de frío es causado por un cambio de fase de los lípidos de la membrana fue propuesto por Dobrins en 1993 (25). Así mismo Holt obtuvo evidencias de que el cambio de fase podría ser el responsable de las manifestaciones de crioinjuria observadas durante el calentamiento celular luego de la descongelación. Estas evidencias fueron obtenidas a partir del estudio de la integridad de membrana de espermatozoides de carnero durante los procesos de enfriamiento (entre $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y posterior calentamiento hasta $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. En este experimento se observó que los mayores daños de membrana ocurrían durante el proceso de calentamiento luego de la descongelación (24).

El estrés de membrana puede continuar por debajo de 0 °C sin que el cambio de fase sea completo a 0 °C, sin embargo es bien conocido que los cambios de fase ocurren, en su mayoría, entre los 5 °C y 15 °C (25). Se ha demostrado la importancia de la composición lipídica del medio ambiente donde se encuentra la membrana plasmática durante el enfriamiento, esto relaciona al componente lipídico en el mecanismo de injuria (19, 26). El agregado de preparaciones lipídicas purificadas a los espermatozoides reduce significativamente el shock de frío y el daño producido por la congelación-descongelación (27, 28, 29). Usualmente se incluye yema de huevo en la preparación de los diluyentes debido a que los fosfolípidos (30) y las lipoproteínas de baja densidad (31) poseen un efecto protector contra el shock de frío. El SDS es un detergente aniónico soluble en agua que se utiliza para solubilizar proteínas. Se ha observado que este detergente posee un efecto benéfico sobre la motilidad e integridad acrosómica relacionado con su acción sobre la yema de huevo (20). Sin embargo no deben pasarse por alto los otros componentes de membrana que pueden alterarse por este stress. Las proteínas integrales de membrana se encuentran asociadas a la bicapa lipídica y es esperable que alteren su función, sobre todo aquellas que cumplen funciones de transporte como las que conforman los canales de calcio. De hecho es bien conocido que la permeabilidad aumenta con el enfriamiento, por lo tanto la regulación del calcio se ve afectada (32, 33). Estos hechos tienen serias consecuencias sobre la funcionalidad celular (34) y muchas veces los cambios ocurridos pueden ser incompatibles con la viabilidad espermática. La absorción de calcio durante el enfriamiento posibilita que ocurran cambios relacionados con el proceso de capacitación como la fusión entre membrana plasmática y la capa externa de la membrana acrosomal. Existe gran similitud entre los cambios ocurridos durante el enfriamiento y la reacción acrosómica, es así que la primera comienza como una versión desorganizada de la segunda. Así mismo, los elementos del citoesqueleto son sensibles a la temperatura. Se ha postulado que la despolimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto es un prerequisite para la aproximación de la membrana plasmática a la membrana acrosomal externa en el camino hacia la exocitosis acrosomal (35).

Crioprotectores y estrés celular

Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y en consecuencia una menor

concentración de electrólitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, estos compuestos, incorporados a los diluyentes producen un estrés transitorio pero importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides. La magnitud de este hecho está íntimamente relacionada con la capacidad penetrante de los crioprotectores (36). El crioprotector de elección es el glicerol, el cual produce estrés osmótico. Se ha observado que la hiperosmolaridad producida por este compuesto posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica (37). Gao (36) ha demostrado que este estrés puede reducirse mediante la incorporación en etapas de glicerol en el proceso de criopreservación. Este procedimiento permite aumentar considerablemente la proporción de espermatozoides sobrevivientes al descongelado. Además del glicerol existen otros compuestos que poseen propiedades crioprotectoras como por ejemplo el etilenglicol (38). Los espermatozoides son también sensibles a los efectos tóxicos de los crioprotectores, es así que los compuestos utilizados habitualmente para criopreservar otras células (ej. Dimetilsulfóxido (DMSO) resultan menos satisfactorios para la criopreservación espermática (39). Se ha observado que el dimetilsulfóxido es más tóxico para los espermatozoides humanos que el glicerol, recuperándose un menor porcentaje de espermatozoides motiles al descongelado cuando se utiliza DMSO como crioprotector. (40).

Estrés osmótico

Mazur estableció que cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la criopreservación. Si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta (41). El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada (42). Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo se nuclean y el agua pura cristaliza formando hielo. Los solutos permanecen disueltos en la fracción de agua líquida y por lo tanto la presión osmótica de la solución aumenta. La proporción de agua cristalizada como hielo y por lo tanto la presión osmótica de la solución restante depende de: la temperatura, la velocidad de descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada.

En general se reconoce que la duración de la exposición a estos eventos debería mini-

mizarse para lograr una óptima sobrevivencia, implicando entonces que el enfriamiento celular debería ser rápido. Sin embargo la tasa de enfriamiento debe ser suficientemente lenta como para permitir la salida de agua intracelular gracias a la presión osmótica extracelular, y prevenir la formación de cristales de hielo intracelular, lo cual es letal para la célula. Las células espermáticas son congeladas a tasas bastante rápidas, en el rango de 15-60 °C/min, lo cual ha sido empíricamente calculado como la velocidad de congelación que permite mayor probabilidad de obtener una mejor tasa de sobrevivencia celular. Conociendo la permeabilidad hídrica celular y su activación energética podría predecirse la máxima tasa de enfriamiento compatible con el equilibrio osmótico y entonces determinar protocolos óptimos de criopreservación. Se ha demostrado que estas consideraciones son importantes para otros tipos celulares (43). La célula espermática de muchas especies posee una mayor permeabilidad al agua que otros tipos celulares (38, 44, 45).

Es importante considerar que la población espermática, tanto en diferentes especies como en un individuo en particular es muy heterogénea. Un eyaculado posee una diversa población de células con diferentes estados de maduración. Las diferencias entre poblaciones espermáticas entre especies y en un eyaculado simple se relacionan con la composición y fluidez de la membrana celular, características que influyen su permeabilidad al agua y a solutos así como su susceptibilidad a la injuria por frío (46).

Holt y North (24) han demostrado que los signos de estrés manifestado por los espermatozoides luego de la descongelación no se relacionan solo con el estrés osmótico sufrido en el descongelado sino también con el estrés sufrido durante el congelado.

El porcentaje de células que sobrevive a un proceso de congelación está determinado por la sensibilidad al estrés osmótico durante la adición y remoción de crioprotectores y durante el enfriamiento y el calentamiento. Si bien puede haber diferencias entre especies en la sensibilidad espermática a la criopreservación, el eyaculado es heterogéneo con una resistencia variable al estrés osmótico entre las células. El hecho de que los individuos puedan ser clasificados como "buenos congeladores" o "malos congeladores" implica que ciertas características de estructura de membrana, las cuales pueden estar genéticamente determinadas, predisponen a la superviven-

cia bajo el estrés de criopreservación (18).

A pesar de que optimicemos el proceso de criopreservación y minimicemos el riesgo de muerte celular, una parte de la población celular no es capaz de sobrevivir. Por lo tanto es necesario concentrarse en la funcionalidad de la población superviviente (39).

ALTERACIONES OBSERVADAS EN LOS ESPERMATOZOIDES SOBREVIVIENTES A LOS PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN

Se ha comprobado que la motilidad espermática disminuye luego de la criopreservación.

En tanto que una pequeña parte de la población celular exhibe un movimiento progresivo vigoroso, la mayoría de las células muestran un variable grado de alteración de la motilidad en comparación con la motilidad del semen fresco. Este hecho puede estar íntimamente relacionado con la pobre capacidad fecundante del semen congelado. En un estudio de FIV con semen criopreservado realizado en humanos se encontró que tanto motilidad progresiva como vigor eran factores relacionados estrechamente con la fertilidad (47).

Los cambios de temperatura inducen a que los espermatozoides se comporten como si se capacitaran (1). Los espermatozoides enfriados muestran un aumento del calcio libre intracelular así como coloración con clortetraciclina, cambios típicos de la capacitación, sin embargo los patrones de fosforilación de tirosina son diferentes en espermatozoides enfriados y recalentados (1). Estos hechos marcan que si bien los cambios inducidos por la criopreservación en la célula espermática son similares a la capacitación los procesos difieren en algunos aspectos.

Se ha demostrado que los procesos de criopreservación inducen a la formación de especies reactivas de oxígeno las cuales poseen efectos tóxicos sobre las células y comprometen su funcionalidad (48, 49). Diferentes antioxidantes han sido usados como parte de variados diluyentes en distintas especies y se ha verificado el efecto benéfico de los mismos (50). Sin embargo no debe olvidarse que el daño oxidativo es solo un de los diferentes factores de estrés al que es sometido el espermatozoide durante el proceso de congelación (48).

Recientemente se ha estudiado la capacidad de la población celular superviviente para

interactuar con el epitelio del oviducto (51). Se ha demostrado que en la interacción de receptores celulares se combinan mecanismos intracelulares de transmisión de señales. Un tipo de interacción similar ocurre entre óvulo y espermatozoide (52). Estudios del efecto de la congelación sobre la membrana celular sugieren que la agrupación de las proteínas durante la fase de separación lipídica inducida por el enfriamiento no es enteramente reversible, esto podría tener implicancias sobre la estructura de los receptores y por lo tanto sobre la interacción de gametas. Si bien estudios de fertilización *in vitro* han demostrado que los espermatozoides criopreservados son capaces de fertilizar (51), sólo algunos acceden al proceso pero muchos otros podrían estar estructuralmente afectados y ser incapaces de fertilizar.

Si bien no ha sido estudiada extensamente la relación entre semen criopreservado y sobrevida embrionaria, se sugirió la asociación entre espermatozoides congelados y aumento en la incidencia de mortalidad embrionaria temprana (12). La ocurrencia de daños a nivel del DNA luego del proceso de criopreservación, podrían relacionarse con daños funcionales nucleares (52).

CONCLUSIONES

Para que sea posible la interacción óvulo-espermatozoide y el comienzo de una nueva vida, el espermatozoide debe ser capaz de expresar su capacidad funcional a través de la ocurrencia de variados procesos con una adecuada secuencia temporal. Es así que un número suficiente de espermatozoides fértiles debe arribar a la ampolla para encontrarse con los oocitos y que ocurra así la secuencia de eventos necesarios para la fertilización.

Durante el proceso de criopreservación los espermatozoides se ven sometidos a variados y diversos tipos de estrés, lo cual puede inducir, en la célula espermática, daños letales o sub-letales los cuales comprometen su funcionalidad.

La identificación de la población espermática intacta así como el descarte de la población viva pero con daños sub-letales, permitiría optimizar el uso del semen criopreservado y evitar la ocurrencia de potenciales errores genéticos con aumento de pérdidas embrionarias. El estudio funcional de las células y de los diferentes tipos de reacción celular en relación al estrés medio-ambiental y a las diferencias individuales (celulares interespecie e interindividuo) son dos puntos

claves en el entendimiento y posibilidad de manejo del tipo y grado de daño celular.

Durante los últimos 50 años los avances obtenidos en la criopreservación de semen han tenido un profundo impacto sobre la biotecnología reproductiva humana y animal. Sin embargo muchos tópicos sobre la criopreservación de semen permanecen oscuros. Futuras investigaciones sobre este tema permitirán obtener nuevos avances en el área.

BIBLIOGRAFÍA

1. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.* 1995; 7: 781-791.
2. Crister JK, Huse-Benda AR, Aaker DD, Arneson BW, Ball GD. (1987). Criopreservación de human spermatozoa. Post-thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril.* 1987; 47: 980-984.
3. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science.* 2000; 60-61: 481-492.
4. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological system. *Science.* 1970; 168: 939-949.
5. Parks JE, Grahan JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology.* 1992; 38:209-222.
6. Mazur P, Leivo S P, Chu E H Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Experimental cell research.* 1972; 71: 345-355.
7. Hunter RHF, Preovulatory arrest and periovulatory redistribution of competent spermatozoa in the asthmus of the pig oviduct. *J. Reprod. Fertil* 1984, 72: 203-211.
8. Hunter RHF, Ovarian control of very low sperm / egg ratios at the commencement of fertilization to avoid polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.* 44: 417-422. 1996
9. Amann RP, Hammersted R H. *In vitro* evaluation of sperm quality. An opinion. *J Androl.* 1993; 14: 397-406.
10. Dumbar BS O'Rand M G. eds, A comparative overview of mammalian fertilization. New York Press. 1983; 139-175.
11. Maxwell WMC. Artificial insemination of ewes whit frozen thawed semen at a synchronized oestrus: II. Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. *Anim Reprod Sci.* 1986, 10: 309-316.
12. Maxwell Evans WMC, Evans G, Rhodes SL, Hillard M A, Bindon BM. Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviductal insemination with low number of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Repro Fertil Dev.* 1993, 5: 57-63.
13. Chen Y, Foote RH, Tobback C, Zhang L, Hough S. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen

- at different rates in egg yolk-tris and whole milk extenders. *J Dairy Sci.* 1993; 76: 1028-1034.
14. Dhama AJ, Sahni KN, Mohan G. Effect of various cooling rates (from 30 °C to 5 °C) and thawing temperatures on the deep freezing of *Bos Taurus* and *Bos bubalis* semen. *Theriogenology.* 1992 38: 565-574.
15. Glaub JC, Mills RN, Katz DF. Improved motility recovery of human spermatozoa after freeze preservation via a new approach. *Fertil Steril.* 1976; 27: 1283-1291.
16. Cohen J, Felten P, Zeilmaker GH. *In vitro* fertilizing capacity of fresh and cryopreserved human spermatozoa: a comparative study of freezing and thawing procedures. *Fertil Steril.* 1981; 36: 356-362.
17. Blach EL, Amann RP, Bowen RA, Frantz D. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membranes integrity and motion characteristics. *Theriogenology.* 1989; 3: 283-298.
18. Leivo SP, Bradley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa in Gagnon, C. (Eds) *The male gamete.* McGill University. 1999; 46: 502-517
19. Watson PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fert.* 1981; 62: 483-492.
20. Pursel VG, Shulman LL, Jonshon LA. Effect of Orvus ES paste on acrosomal morphology, motility and fertilizing capacity of frozen thawed boar sperm. *J Anim Sci.* 1978; 47: 198-202.
21. Crowe J, Carpenter J, Crowe L, Anchoroguy T J. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents. 26 th Annual meeting of the society for cryobiology, Charleston, South Carolina. 1989; 219-224.
22. Chen T, Fowler A, Torner, M. Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose - water binary mixture. *Cryobiology* 2000; 40: 277-282.
23. Bakás LS; Disalvo EA. Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective activity of trehalose. *Cryobiology.* 1991; 28: 347-353.
24. Holt WV, North RD. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1991; 91: 451-461.
25. Dobrins EZ, Crowe LM, Berger T, Anchoroguy T, Oversteet JW, Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model *J Exp Zool.* 1993, 265: 432-437.
26. Pettit MJ, Bhur MM. Extender components and surfactants after boar sperm function and membrane behavior during criopreservation. *J Androl.* 1998, 19: 736-746.
27. Butler WJ, Roberts TK. Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or slow cooling. *J Reprod Fertil.* 1975, 43: 183-187.
28. Parks JE, Meacham TN, Saacke RG. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids and viability at 4 °C and 37 °C. *Biol Reprod.* 1981; 24: 399-404.
29. Graham JK, Foote RH. Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull. *Cryobiol.* 1987, 24: 42-52.
30. Quinn PJ, Chow PYW, White IG. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site. *J Reprod Fertil* 1980; 60:403-407.
31. Foulkes JA. The separation of lipoproteins from eggs yolk and their effect on motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod. Fertil* 1977; 49: 277-284.
32. Robertson L, Watson PF. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J Reprod Fertil.* 1986, 77: 117-185.
33. Robertson L, Watson PF, Plunner JM. Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. *Cryo-Lett.* 1988, 9: 286-293.
34. Bailey J L, Bhur M.M. Cryopreservation alters the Ca⁺⁺ flux of bovine spermatozoa *Can. J. Anim. Sci.* 1994, 74: 45-51.
35. Spungin B, Maregalit I, Britbart, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J Cell Sci.* 1995; 108: 2525-2535
36. Gao GY , Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Crister JK. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod.* 49: 112-123. 1993
37. Aitken RJ, Wang YF, Liu J, Best F, Richardson DW. The influence of medium composition osmolarity and albumin on acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int J Androl.* 1983, 6: 180-193.
38. Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Crister JK. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human sperm spermatozoa. *Hum Reprod.* 1997; 12: 112-118.
39. Katkov II, Katkova N, Crister JK, Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentration of glycerol: chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology.* 1998, 37: 325-338.
40. Chong AP. Artificial insemination and sperm banking: clinical and laboratory considerations. *Semin Reprod Endocrinol.* 1985; 3: 193-200
41. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol.* 1984; 247:125-142.

42. Watson PF, Duncan AE. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*. 1988, 25: 131-142.
43. Mazur P. Freezing of living cells. Mechanism and implications. *Am J Physiol*. 1984, 147: 125-142.
44. Noiles EE, Mazur P, Watson PF, Kleinhans FW, Crister JK. Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its activation energy. *Biol Reprod*. 1993, 48: 99-109.
45. Noiles EE, Thompson KA, Storey BT. Water permeability, L_p , of mouse sperm plasma sperm cytoskeleton. *Cryobiology*. 1997, 35:79-92
46. Hammerstedt RH, Parks JE. Changes in sperm surfaces associated with epididymal transit. *J Reprod Fert*. 1987; 34: 133-149.
47. Kelly MP, Corson SD, Social B, Batzer FR, Gutman JN. Discontinuous Percoll gradient preparation for donor insemination: determinants for success. *Human Reprod*. 1997, 12: 2682-2686.
48. Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl*. 1992, 13: 232-241.
49. Bell M, Wang R, Hellestron WJ, Sikka, SK. Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *J Androl*. 1993, 14: 472-478.
50. Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A. Effect of antioxidant tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch Androl*. 1994, 33: 11-15
51. Ellinton JE, Samper JC, Jones AE, Oliver SA, Brunett KM, Wright RW. *In vitro* interaction of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products *Anim Reprod*. 1999, 56: 51-65.
52. Ellinton JE, Evenson DP, Fleming JE, Brisbois RS, Hiss GA, Broder SJ, Wright RW. Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. *Fertil Steril*. 1998, 69: 643-649.