



XV Master Reproducción Humana



Técnicas de congelación y descongelación de espermatozoides

Dra. R. Núñez Calonge

Breve resumen histórico

- Congelación espermatozoides (SPALLANZANI) 1776 en la nieve
- POLGE en 1949 descubre el glicerol como crioprotector
- En 1953 primer nacimiento con semen congelado
- 1970 primeros bancos de semen





ES IMPRESCINDIBLE CONOCER LA
BIOLOGIA DE LA CRIOPRESERVACION

Biología de la criopreservación

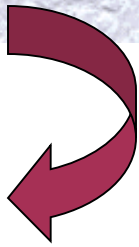
- 1.- Formación de cristales de hielo extracelulares (-5°C)
- 2.- Incremento en la concentración de todos los solutos de la fase líquida.
- 3.- Se favorece la difusión osmótica de agua al interior celular
- 4.- La presión de vapor del agua superenfriada es mayor que la del hielo, y crea una fuerza que promueve el movimiento del agua hacia fuera (-15 a -80°C).



Deshidratación

Biología de la criopreservación

El principal problema para todas las células es la muerte celular debido a:



Osmolaridad del
medio



Cristales de hielo

Para paliar los efectos de la congelación:

-Velocidades adecuadas

-Crioprotectores:

Penetrantes (glicerol)

No penetrantes (yema de huevo)



Velocidad de deshidratación

- La velocidad a que pierde agua una célula depende de varios factores
- Determinante para una óptima criopreservación.

Velocidad de congelación

Demasiado alta

Pérdida lenta de agua

Agua intracelular

Cristalización

Demasiado baja

Medio hiperosmótico

Desnaturalización proteínas

Citolisis

Daño celular



Crioprotectores penetrantes

- Pasan a través de la membrana celular
- Ejercen una acción de desplazamiento de agua
- Impiden la entrada de agua
- Se forman menos cristales de hielo
- Citotóxicos a altas concentraciones

-DMSO (dimetilsulfóxido)

-PROH (propanodiol)

-Glicerol

Descongelación: Rehidratación

Es el proceso inverso a la deshidratación. Debe realizarse lentamente, por pasos, llevando la célula a concentraciones cada vez más bajas de crioprotector.

Descongelación: Rehidratación

Si la concentración de crioprotector en el medio es demasiado baja, aumentará la osmolaridad, y la célula se hinchará y lizará.

Crioprotectores NO penetrantes

- Es una protección extra frente al hinchamiento de la célula durante la rehidratación.
- Añadiendo una sustancia no penetrante, se aumenta la osmolaridad.

Sacarosa
Dextrano
Yema huevo

Congelación de espermatozoides



A black and white photograph of a snowy park path. The path is covered in a thick layer of snow, and the trees lining both sides are heavily laden with snow. A street lamp stands on the right side of the path, and a low hedge is visible in the foreground on the right. The scene is peaceful and wintry.

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO

19625

REAL DECRETO 1301/2006, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos.

Fertil Steril. 2008 Feb 2

[Jeyendran RS](#), [Acosta VC](#), [Land S](#), [Coulam CB](#)

Cryopreservation of human sperm in a lecithin-supplemented freezing medium

The use of egg yolk and serum albumin as additive diluents for human sperm cryopreservation is routine. But because both diluents are of animal origin, they potentially may introduce microbial agents to the sample. To reduce the risk of contamination, the cryoprotective property of phospholipids extracted from lecithin was evaluated and found to be effective when supplemented with dimethyl sulfoxide and glycerol. (Fertil Steril® 2008; ■:■–■. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine.)

The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa separated for use in assisted reproductive technology is unaffected by the type of cryoprotectant used but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation

Laura Kelly Thomson, B.Med.Sc.,^a Steven Denis Fleming, Ph.D.,^b Lauren Schulke, M.Med.,^a Katrina Barone, B.Sc.,^a Julie-Anne Zieschang, M.Med.,^a and Anne Melton Clark, M.P.S., M.B.C.H.B., F.R.C.O.G., F.R.A.N.Z.C.O.G., C.R.E.I.^a

^a Fertility First, Hurstville; and ^b Department of Obstetrics and Gynecology, Westmead Hospital, University of Sydney, Sydney, Australia

Fertility and Sterility® Vol. 92, No. 3, September 2009

Copyright ©2009 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

Comparison of different cryoprotectants.

Cryoprotectant	n	Mean age, years	Mean length of sexual abstinence, days	Mean prefreeze fragmentation, %	Mean frozen- thawed fragmentation, %	Mean difference	P
SpermCryo	40	36.7	3.3	24.7	31.3	6.6	.002
All-round							
SpermCryo	40	35.1	2.8	24.1	34.8	10.7	<.001
medium							
Freezing medium	40	38.4	2.9	22.8	29.5	6.7	<.001
with TYB							
Quinn's Advantage	40	37.4	3.2	23.2	28.9	5.8	.009
Sperm Freeze							
MediCult	40	38.8	2.9	27.7	34.5	6.8	<.001
CryoSperm							
MediCult	40	38.9	3.3	25.2	29.3	4.1	.066
Sperm							
Freezing							
Medium							
Fertipro	40	37.7	2.9	26.3	30.9	4.6	.027
SpermFreeze							
None	40	36.2	2.9	28.9	34.7	6.8	.003

Thomson. Cryoprotectants and sperm DNA integrity. Fertil Steril 2009.

Research Article

Evaluation of the Efficiency of Two Different Freezing Media and Two Different Protocols to Preserve Human Spermatozoa from Cryoinjury

Gemma Fabozzi, Maria Flavia Starita, Emilia Rega, Alessandra Alteri,
Antonio Colicchia, Claudio Piscitelli, and Pierluigi Giannini

TABLE 1: Postthaw viability and progressive motility of semen samples cryopreserved by two different freezing protocols using two different FM.

Variable	Group A (sperm washing protocol)		Group B (direct freezing protocol)		P value			
	TYB	SF	TYB	SF	P^a	P^b	P^c	P^d
Viability (%)	21.20 ± 1	15.62 ± 0.71	27.21 ± 1.69	21.71 ± 1.60	<0.0001	<0.0001	0.006	0.0002
Progressive motility (%)	18.41 ± 1.03	13.99 ± 0.87	16.63 ± 1.67	13.38 ± 1.46	<0.0001	0.005	NS	NS

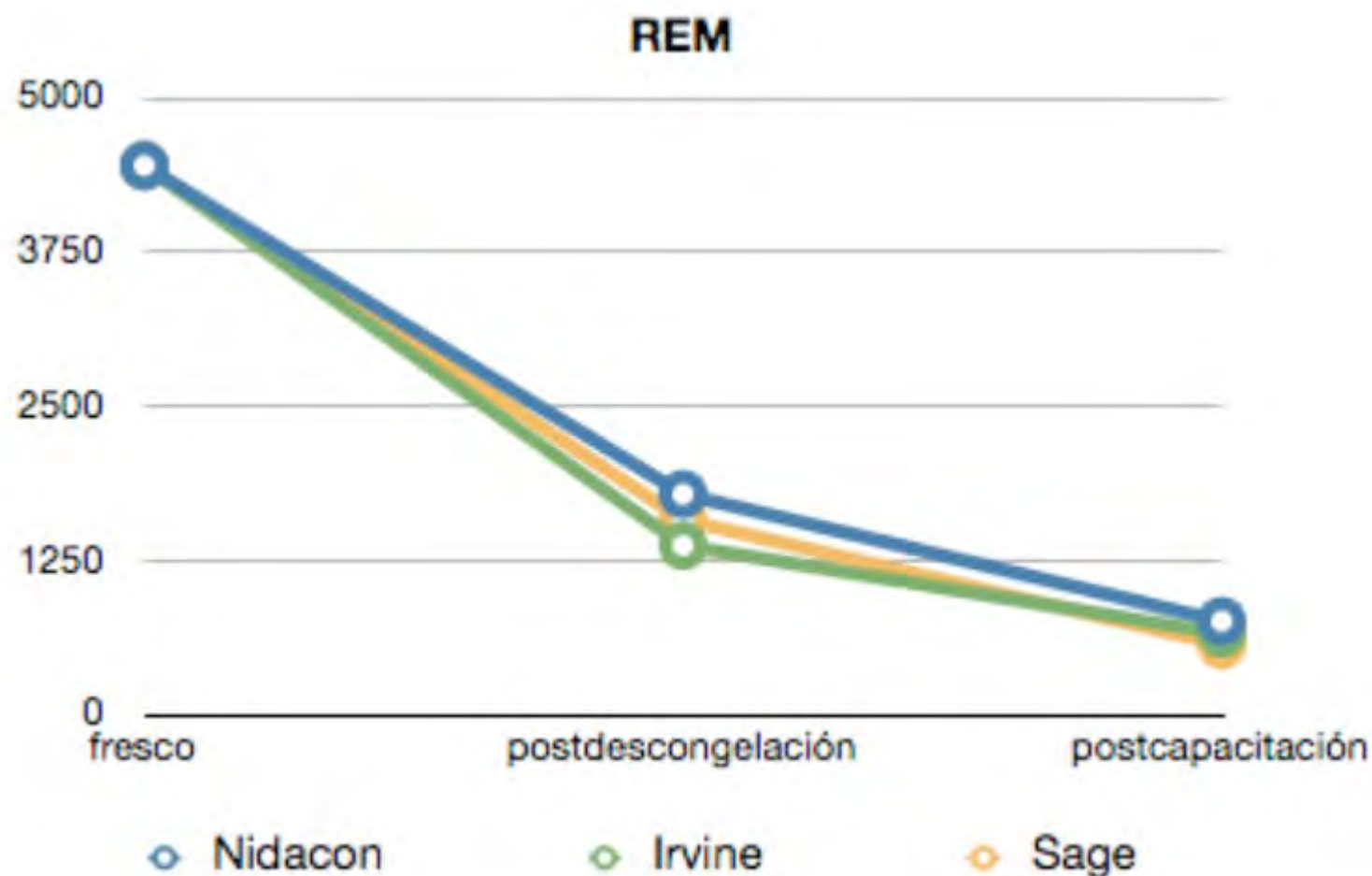
Note: values are mean ± SEM. TYB, TEST Yolk Buffer; SF, Sperm Freeze.

P^a , paired *t*-test for TYB versus SF in group A.

P^b , paired *t*-test for TYB versus SF in group B.

P^c , unpaired *t*-test for TYB washed versus TYB not washed.

P^d , unpaired *t*-test for SF washed versus SF not washed.

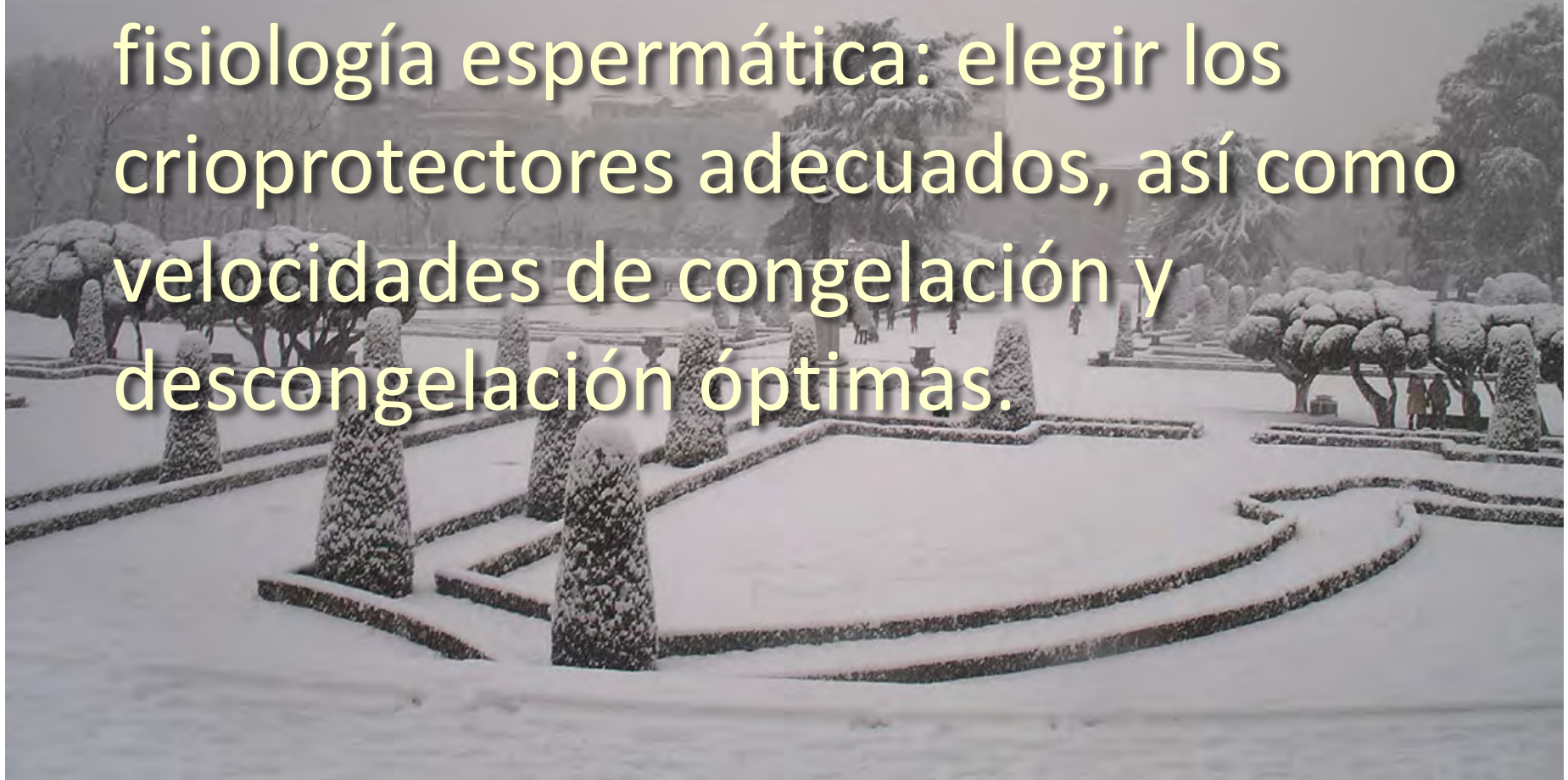


Conclusiones

No hay diferencias significativas en el uso de cualquiera de los tres crioprotectores, por lo que cualquiera de ellos puede utilizarse para la criopreservación de muestras de semen.

Congelación de espermatozoides

Debe realizarse teniendo en cuenta la fisiología espermática: elegir los crioprotectores adecuados, así como velocidades de congelación y descongelación óptimas.



Métodos de congelación

- Criocongeladores { Pajuelas
Criotubos
- Vapores de LN2 → Pajuelas
- Hielo seco → Criotubos



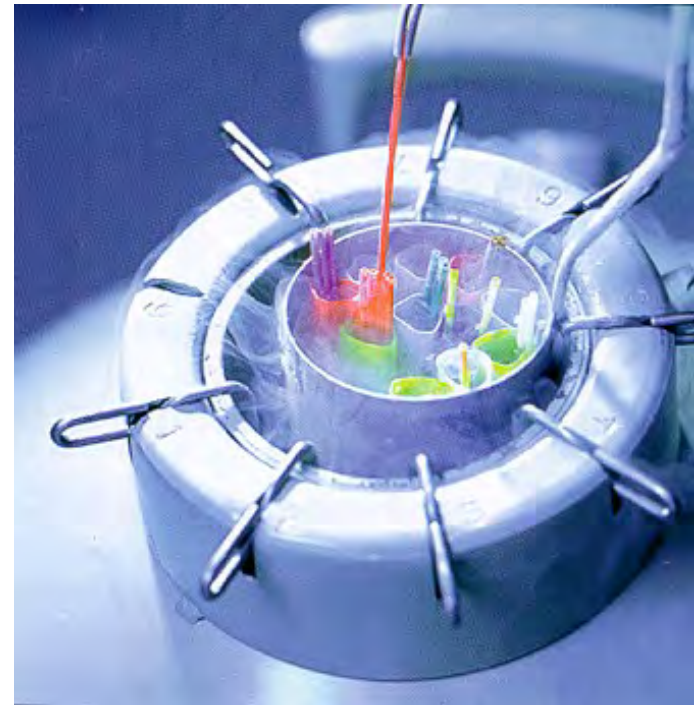
Píldoras



Criotubos



Pajuelas



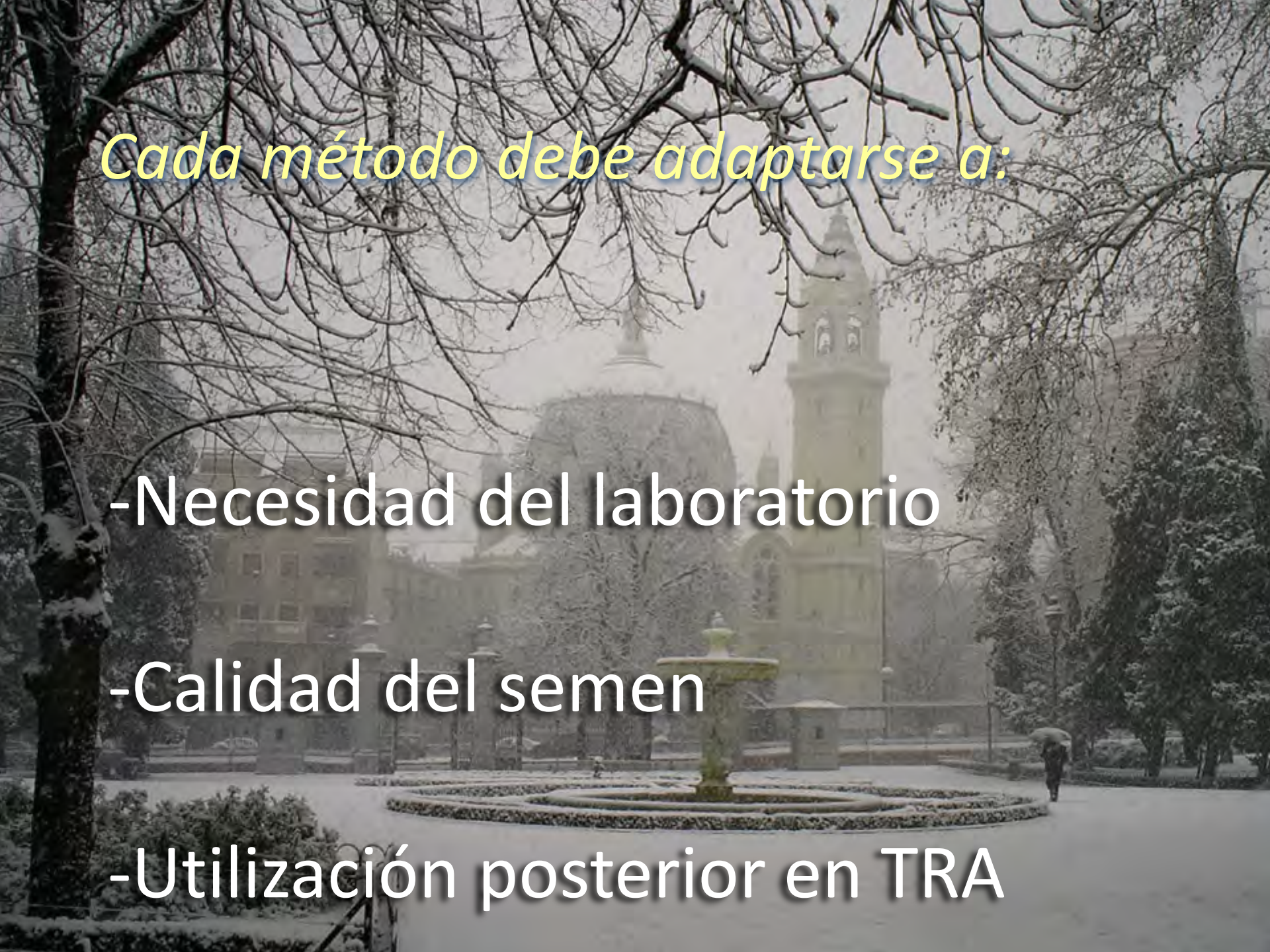
Congelación automática

Planer





Cryologic

A faded, artistic background image of a park in winter. In the foreground, there's a circular stone fountain with water. The ground is covered in snow. In the background, a large church with a dome and a tall bell tower is visible through the bare branches of trees. A person with an umbrella is walking on a path to the right.

Cada método debe adaptarse a:

-Necesidad del laboratorio

-Calidad del semen

-Utilización posterior en TRA

Congelación de semen

- Crioprotector: Tampón TEST-Yolk
- Método: Píldoras y nieve carbónica

Nagasa y Niva, 64; Vázquez 83



Congelación de espermatozoides

TEST-Yolk (CRIOSPERM)

TEST

TRIS

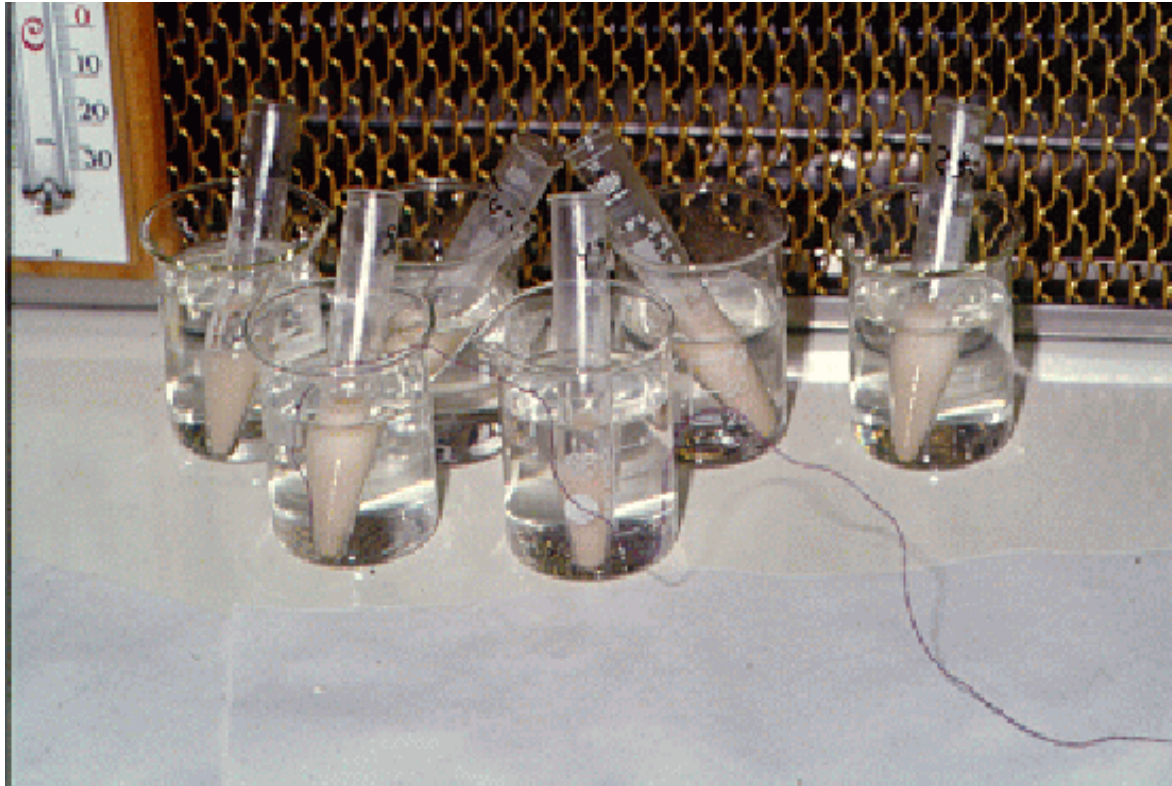
Glucosa

Yema de huevo (20%)

Penicilina/estreptomicina

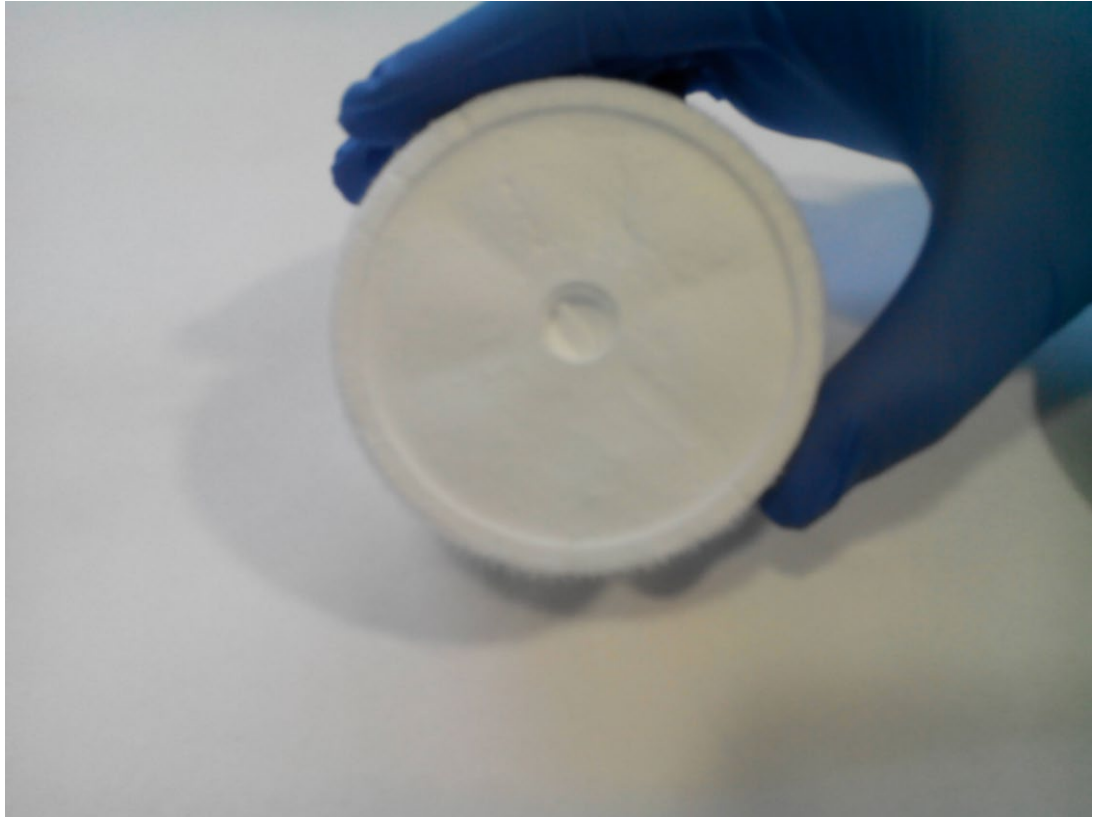
Glicerol (6,5%)

Congelación de espermatozoides



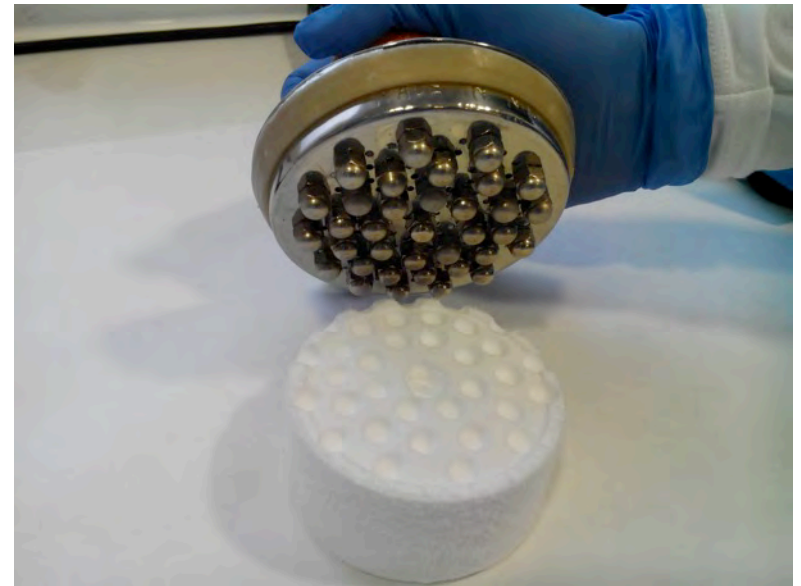
1.- Dilución con el crioprotector volumen/volumen

Congelación de espermatozoides



2.- Preparación de la nieve carbónica

Congelación de espermatozoides

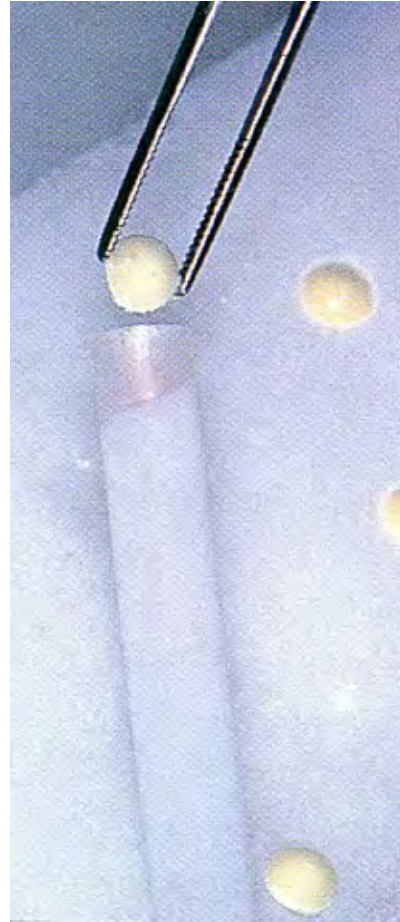


3.- Preparación de los orificios de la nieve carbónica

Congelación de espermatozoides

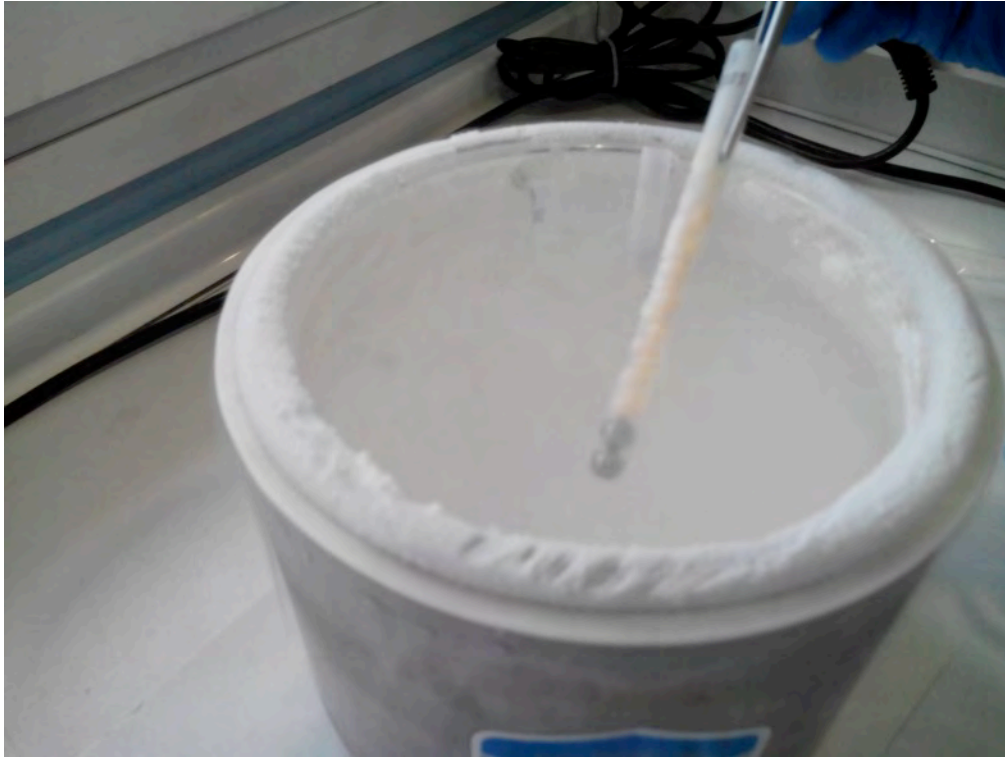


Congelación de espermatozoides



5.- Inserción de las píldoras en los criotubos

Congelación de espermatozoides



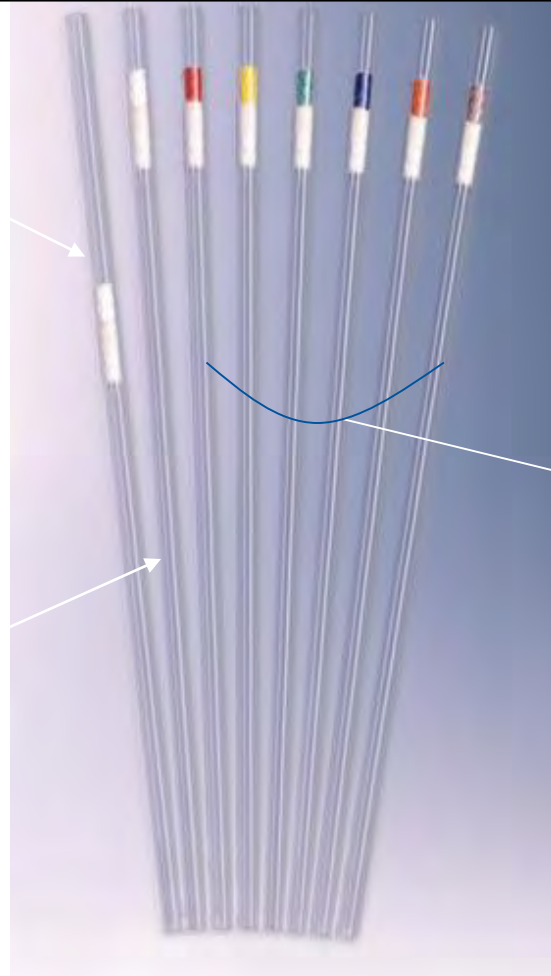
La descongelación debería realizarse a 37°C cuando se congela en vapores o nieve carbónica, y a 22° C cuando se realiza con un criocongelador.

Verheyen et al Human Reprod 8, 1992

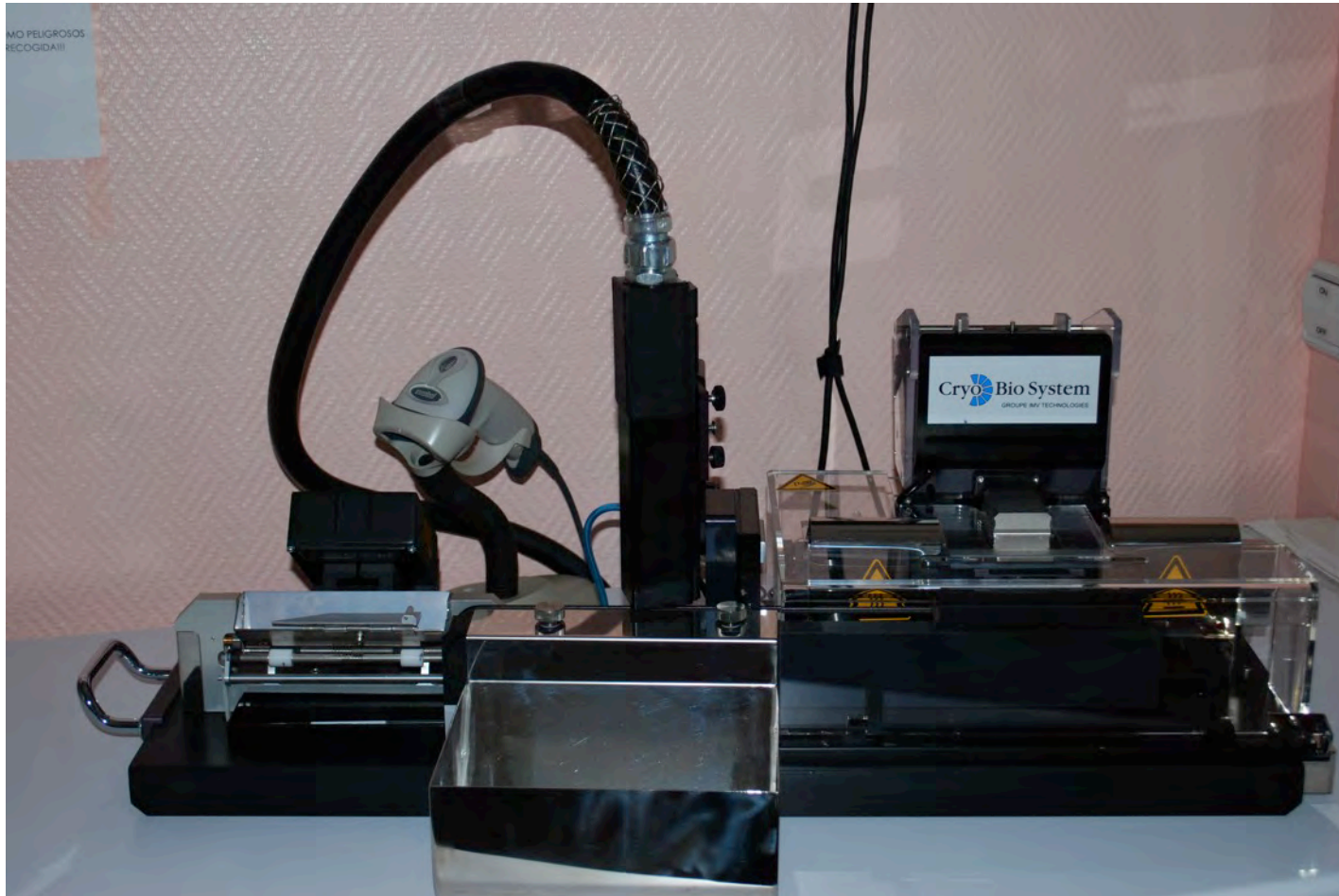
CBS™ High Security Straw



CBS™ High Security Straw



MAPI

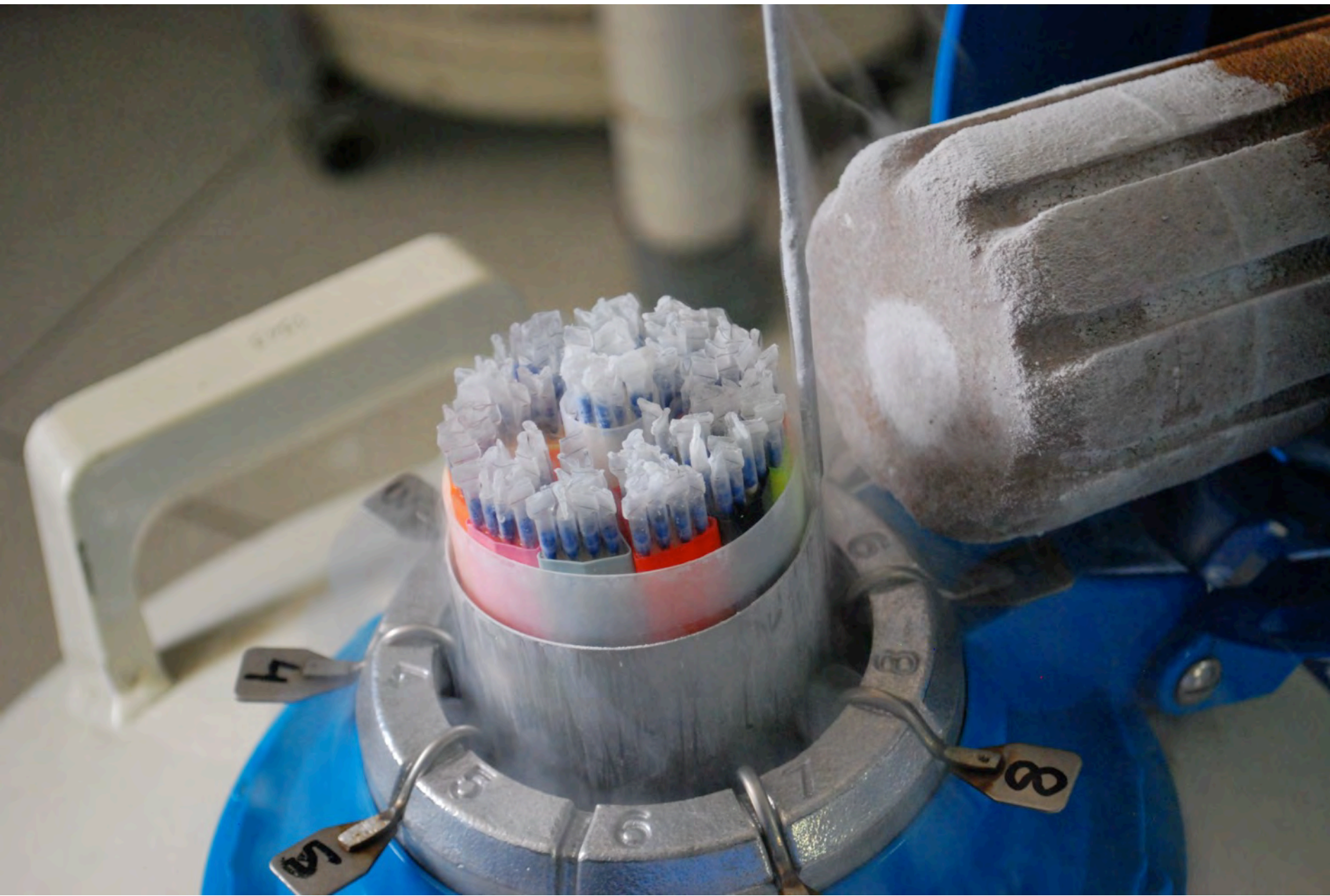




842-200612

858-260612

858-260612





www.sciencedirect.com
www.rbmonline.com



ARTICLE

Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding



Azam Agha-Rahimi, Mohammad Ali Khalili *, Ali Nabi, Sareh Ashourzadeh

RESEARCH COMMUNICATION

Vitrification of a small number of spermatozoa in normozoospermic and severely oligozoospermic samples

Valeriy Kuznyetsov¹, Sergey I. Moskvovtsev^{1,2*}, Michael Crowe¹, Ayub G.-M. Lulat¹, and Clifford L. Librach^{1,2,3}

RESEARCH ARTICLE

Slow Freezing, but Not Vitrification Supports Complete Spermatogenesis in Cryopreserved, Neonatal Sheep Testicular Xenografts

Budhan S. Pukazhenthil^{1*}, Jennifer Nagashima^{1,2}, Alexander J. Travis^{2,3}, Guilherme M. Costa⁴, Enrique N. Escobar⁵, Luiz R. França⁴, David E. Wildt¹



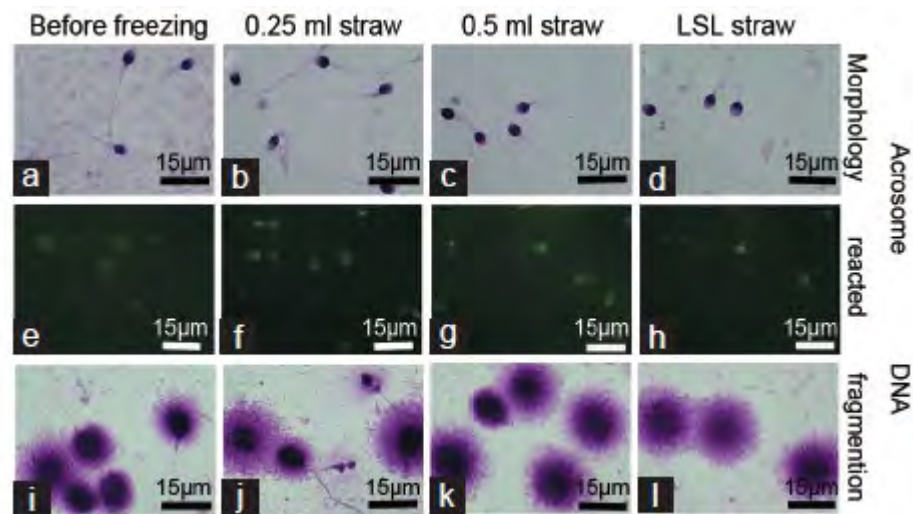
Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Sperm Biology

A novel micro-straw for cryopreservation of small number of human spermatozoon

Feng Liu^{1,2,*}, Sha-Sha Zou^{3,4,*}, Yong Zhu^{3,4}, Can Sun^{3,4}, Yu-Fei Liu^{3,4}, Shan-Shan Wang⁵, Wen-Bo Shi^{3,4}, Jing-Jing Zhu^{3,4}, Yong-Hua Huang⁵, Zheng Li^{1,6}



Aumento de la t° de una dosis durante la descongelación, desde -196° hasta t° ambiente



Abstracts of the 20th Annual Meeting of the ESHRE, Berlin, Germany, 27–30 June 2004

P-404 Effects of thawing procedure on post-thaw motility, sperm nuclear DNA fragmentation and sperm membrane integrity of human spermatozoa

S. Cortes, S. Agustin, M. Gago, E. Ovejero, L. Gonzalez-Viejo,
R. Nunez-Calonge, P. Caballero

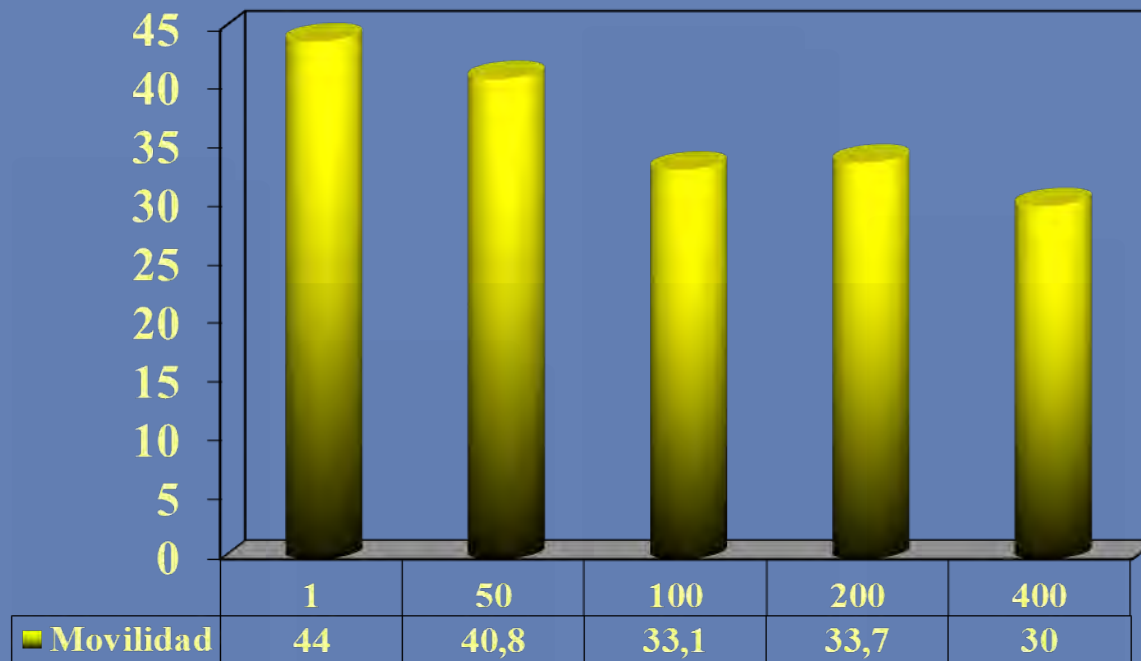
Clinica Tambre, Reproduction Unit, Madrid, Spain



- 1) Sacar el cánister 1 sola vez y descongelar 2 píldoras
- 2) Sacar el cánister 50 veces y descongelar 2 píldoras
- 3) Sacar el cánister 100 veces y descongelar 2 píldoras
- 4) Sacar el cánister 200 veces y descongelar 2 píldoras
- 5) Sacar el cánister 400 veces y descongelar 2 píldoras

Resultados:

Grafico 1: Porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva observada tras la descongelación a diferente número de cambios de temperatura



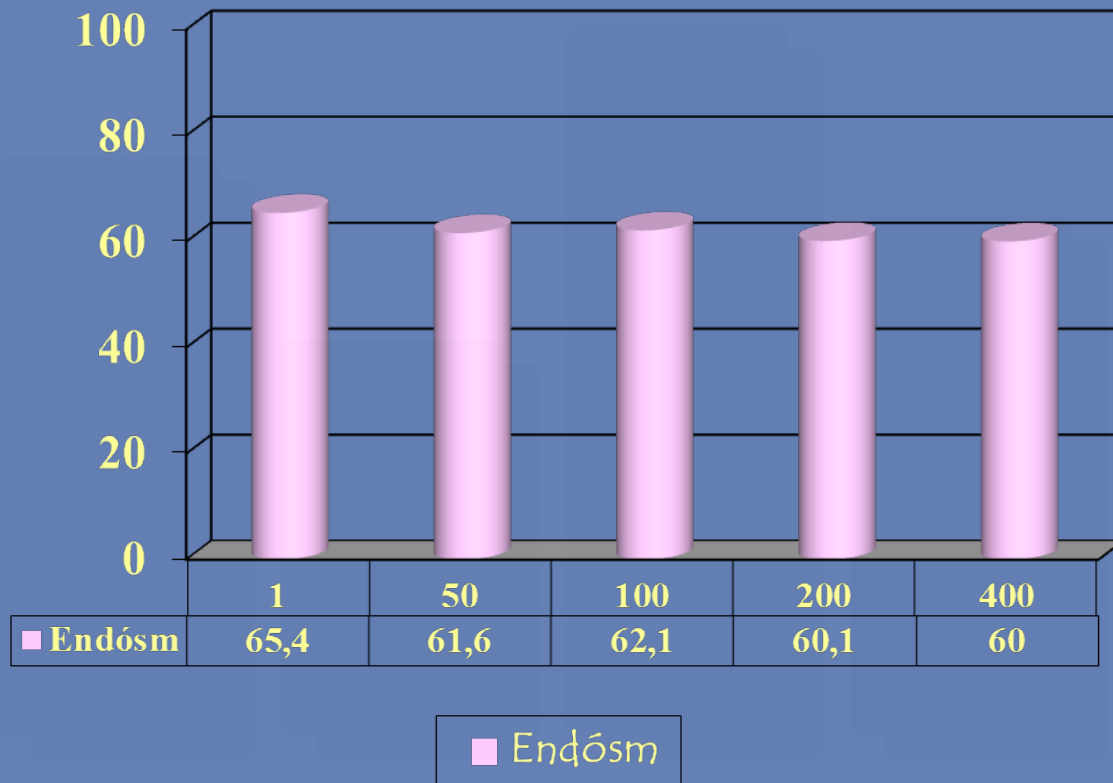
■ Movilidad

Grafico 2: Porcentaje de espermatozoides vivos observado tras la descongelación a diferente número de cambios de temperatura



■ Vivos

Grafico 3: Porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva observado tras la descongelación a diferente número de cambios de temperatura



A close-up photograph of a laboratory experiment. A glass petri dish is held open by several metal clips. Inside the dish, there are several small, colorful vials or droppers. A red liquid is being poured from a glass tube into one of the vials. The background is a blurred laboratory environment.

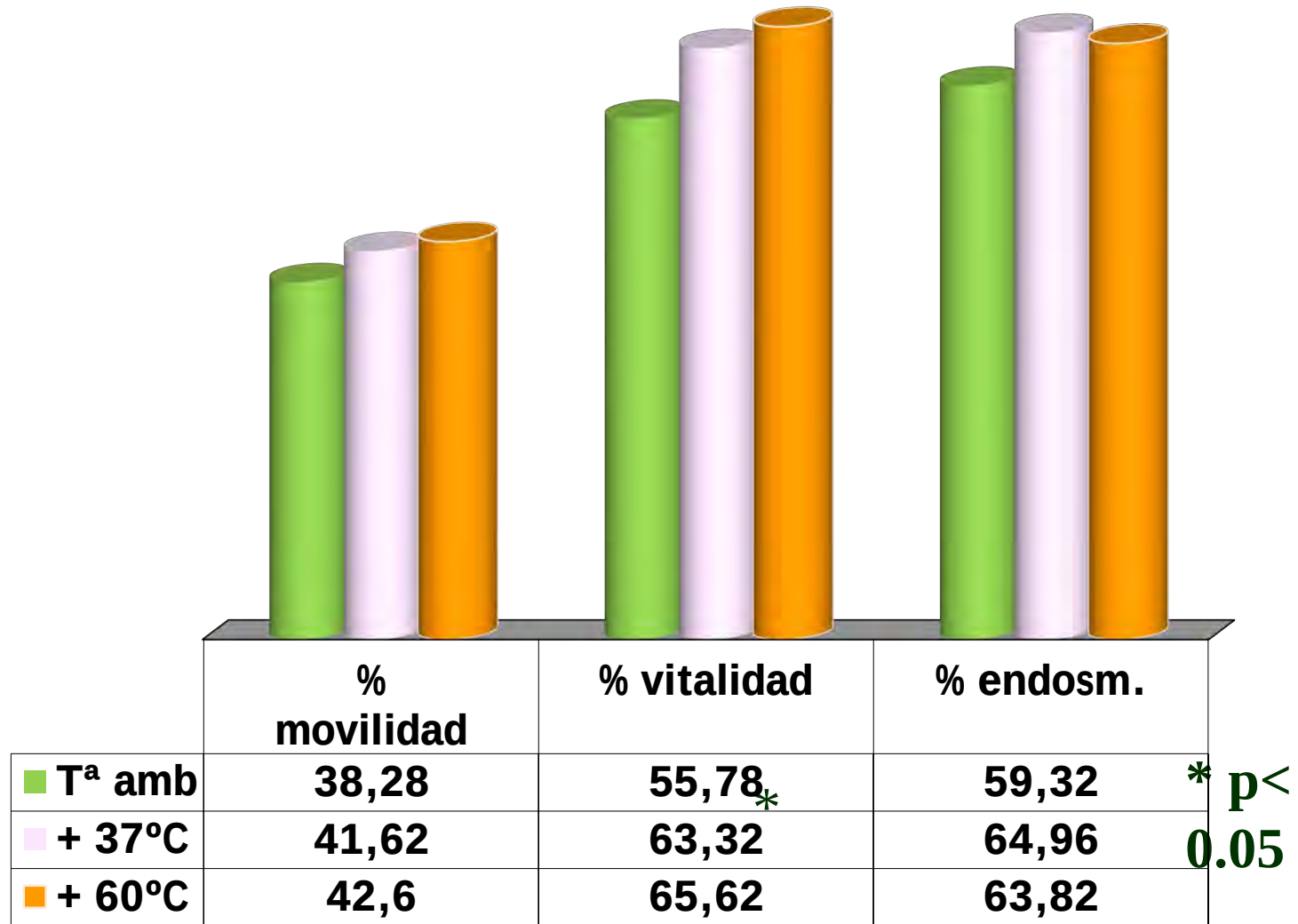
IMPACTO DE LA TEMPERATURA DE DESCONGELACIÓN DE SEMEN , EN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA

E. Ovejero, S. Cortés, S. Agustín, M. Gago, R. Núñez, P. Caballero



- Descongelación de 2 píldoras en cada caso:
 - descongelación a Temperatura ambiente
 - descongelación a 37°C durante 2 minutos
 - descongelación 60°C durante 20 segundos
- Determinación de movilidad a+b (mediante sistema SCA 2002)
- Determinación integridad nuclear (naranja de acridina)
- Determinación de la integridad de membrana (HOS test)

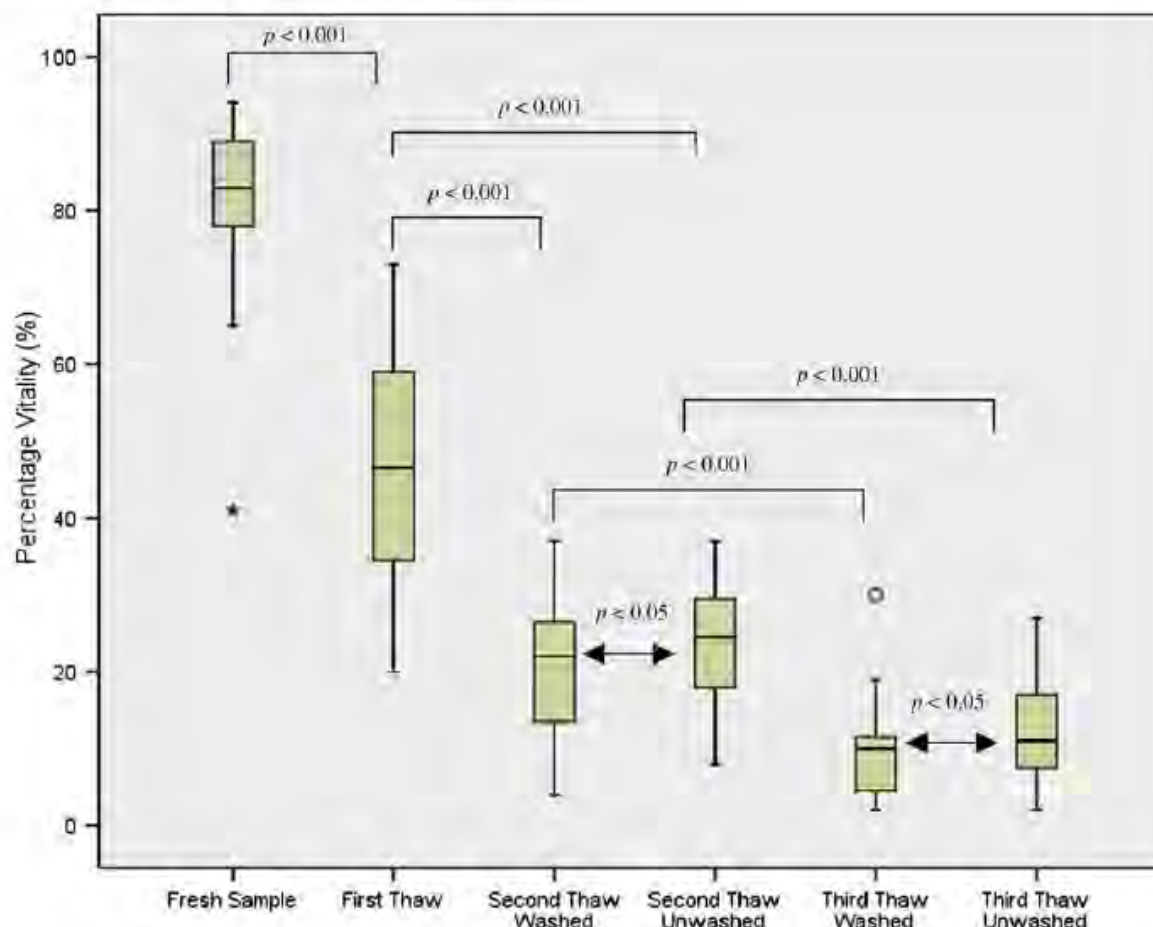
Resultados:



The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation

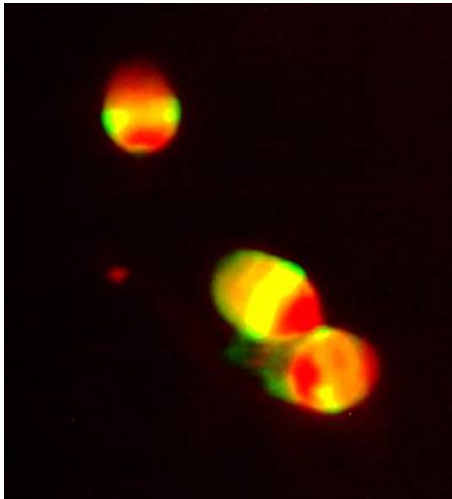
Laura Kelly Thomson, B.Med.Sc.,^a Steven Denis Fleming, Ph.D.,^b Katrina Barone, BSc.,^a
Julie-Anne Zieschang, M.Med.,^a and Anne Melton Clark, MPS, MBCHB, FRCOG, FRANZCOG, CREP^a

Effect of repeated freezing and thawing on vitality.



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.

*Hammadeh et al,
Intern Journal of Andrology, 2001.*



**Es preferible utilizar sistemas
de congelación lentos**

Comparative analysis between slow freezing and ultra-rapid freezing for human sperm cryopreservation

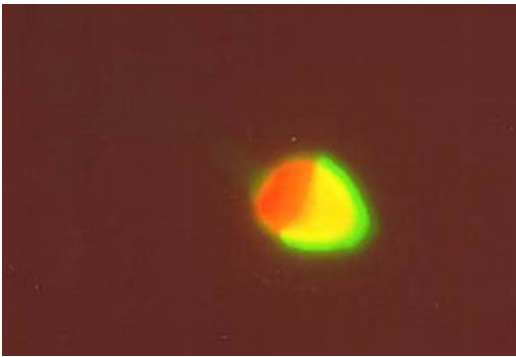
Natalí S. Riva¹, Claudio Ruhlmann¹, Rocío S. Iaizzo¹, Carla A. Marcial López¹, Alejandro Gustavo Martínez¹

¹Fertilidad San Isidro, Buenos Aires, Argentina

CONCLUSION

The present data indicated that ultra-rapid freezing of human sperm with non-permeable cryoprotectants, referred to herein as ultra-rapid freezing, might be a more effective and safer alternative to the slow freezing technique currently in use.

Association between freezing agent and acrosome damage of human spermatozoa from subnormal and normal semen.



*Hammadeh et al
Andrologia 2001.*

Se recomienda el uso del tampón TEST-yolk como crioprotector frente a los efectos deletéreos de la congelación y descongelación de semen.

Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity.

*Donnelly et al,
Fertil Steril 2001.*

La congelación de semen con el plasma seminal mejora la movilidad e integridad del ADN post descongelación.

Sperm preparation after freezing improves motile sperm count, motility, and viability in frozen-thawed sperm compared with sperm preparation before freezing-thawing process

A. Palomar Rios¹ · A. Gascón¹ · J. V. Martínez¹ · S. Balasch² · I. Molina Botella¹

J Assist Reprod Genet (2018) 35:237–245

243

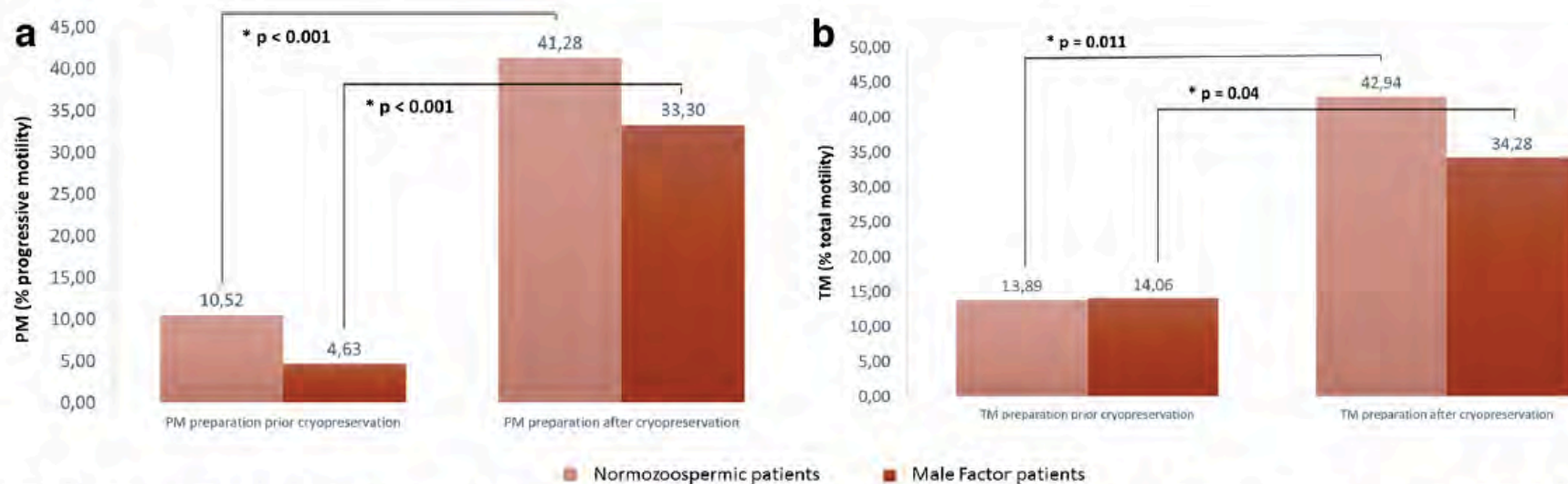


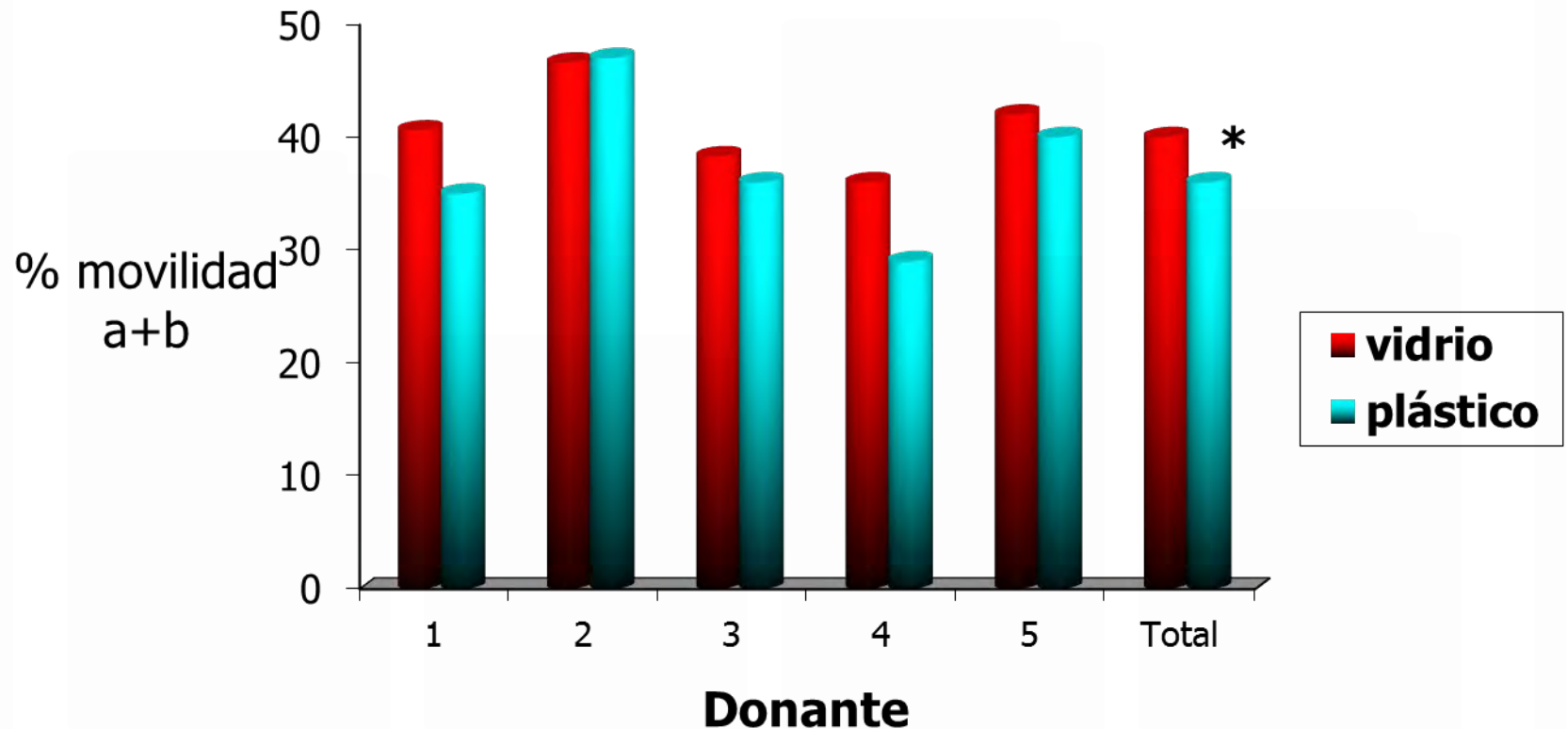
Fig. 2 PM and TM after both cryopreservation protocols in normozoospermic and male factor patients. **a** PM, %progressive motility. **b** TM, %total motility. SD, standard deviation

Influencia del tiempo y material empleado en la descongelación de semen sobre la movilidad espermática.



S.Cortés y col, 2001

% Movilidad progresiva en distintos donantes tras la descongelación de semen en tubos de vidrio y de plástico.



$P < 0,05$

Efectos de la congelación en los espermatozoides:

- Movilidad
- Supervivencia espermática
- Fragmentación ADN

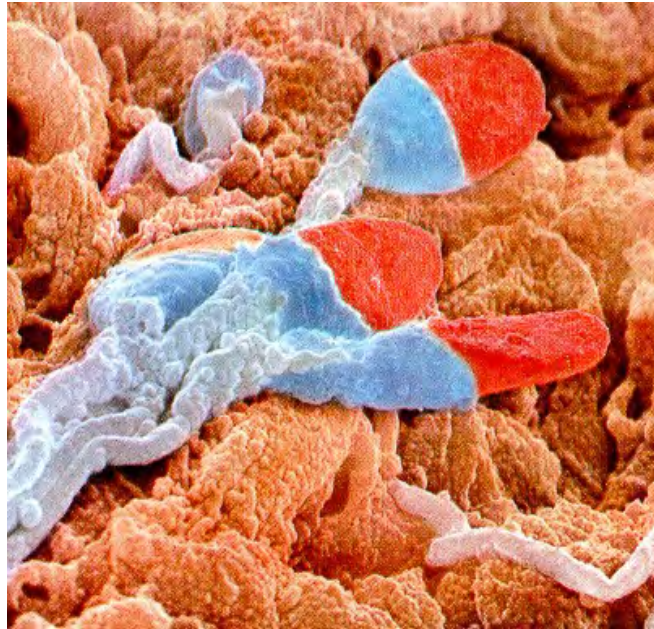


Movilidad post-descongelación

* La **movilidad** es el parámetro espermático que más se afecta, (34 -76%) aunque no se relaciona con la fertilidad.

* La **velocidad** es el parámetro cinético que menos se ve afectado (24 - 32%). (MacLughlin, 92.)

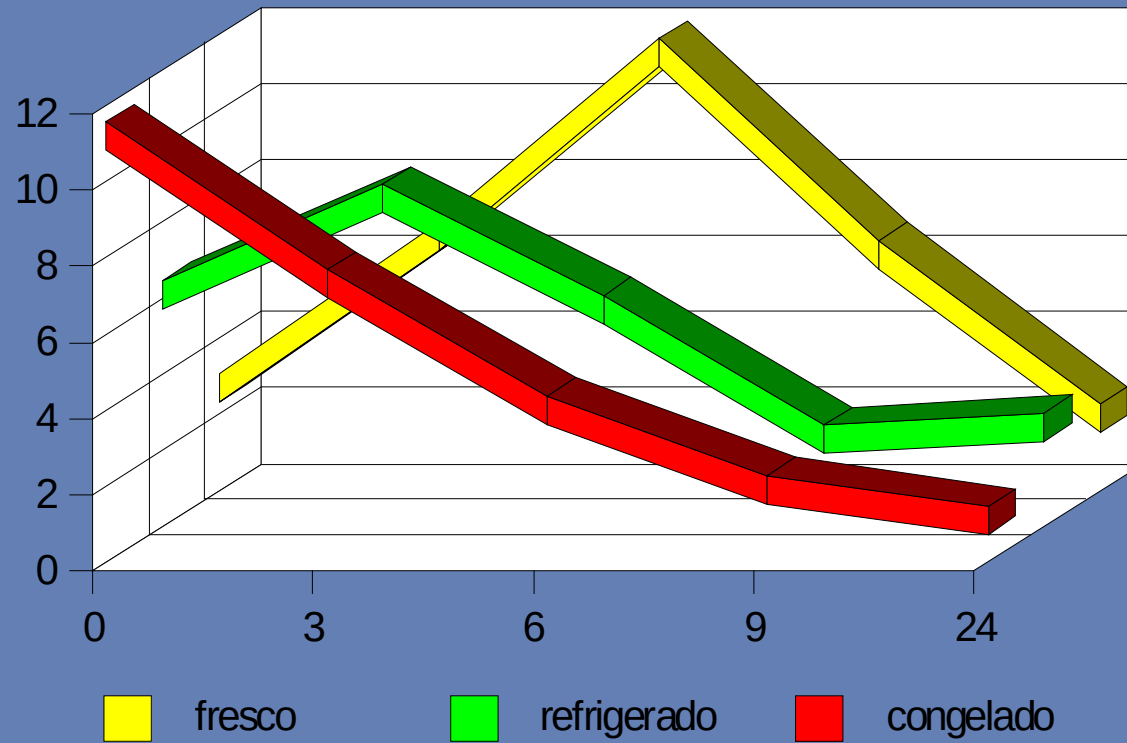
Las diferencias de tasa de fecundación entre semen fresco y congelado estriban



EN LA CAPACITACION ESPERMATICA

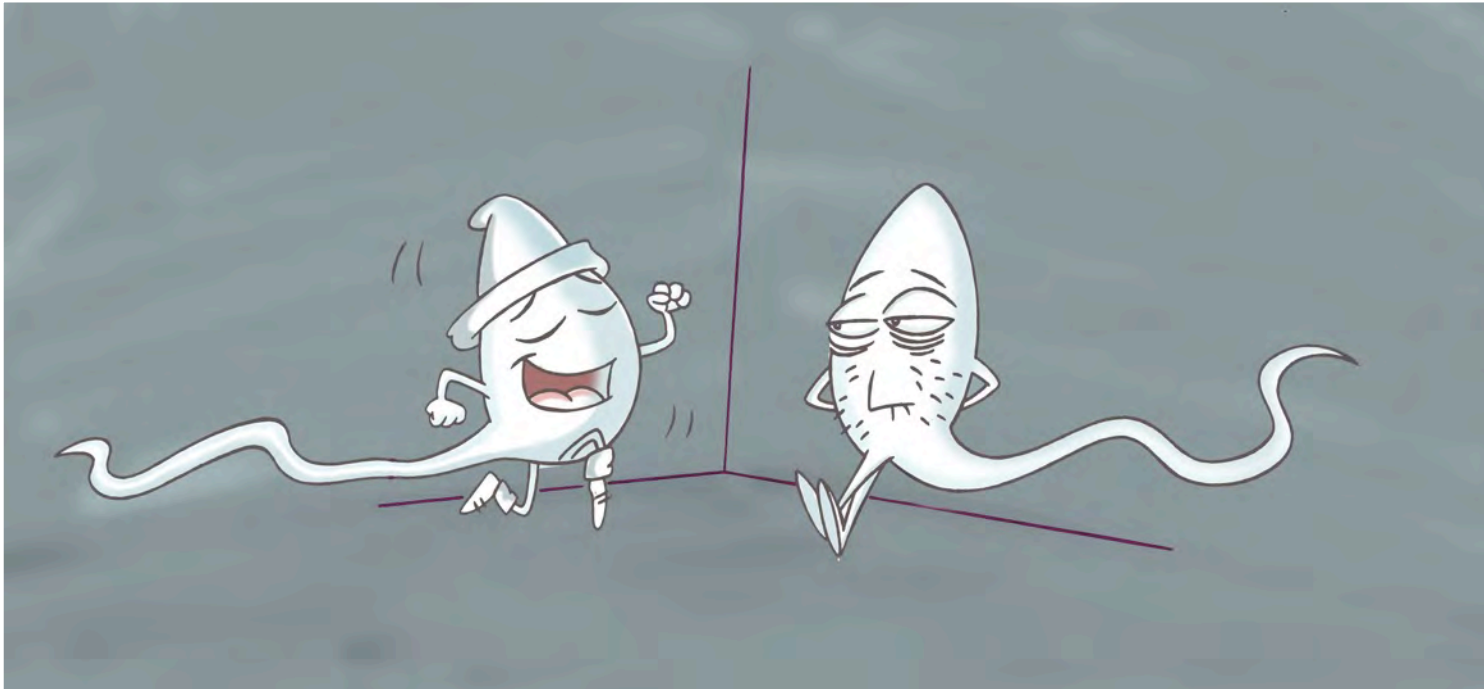
EN LA CAPACITACION ESPERMATICA

% Espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado durante 24 hr de capacitación en semen caprino.



S.Cortés, 96

Los espermatozoides congelados
sufren antes la reacción acrosómica



Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors

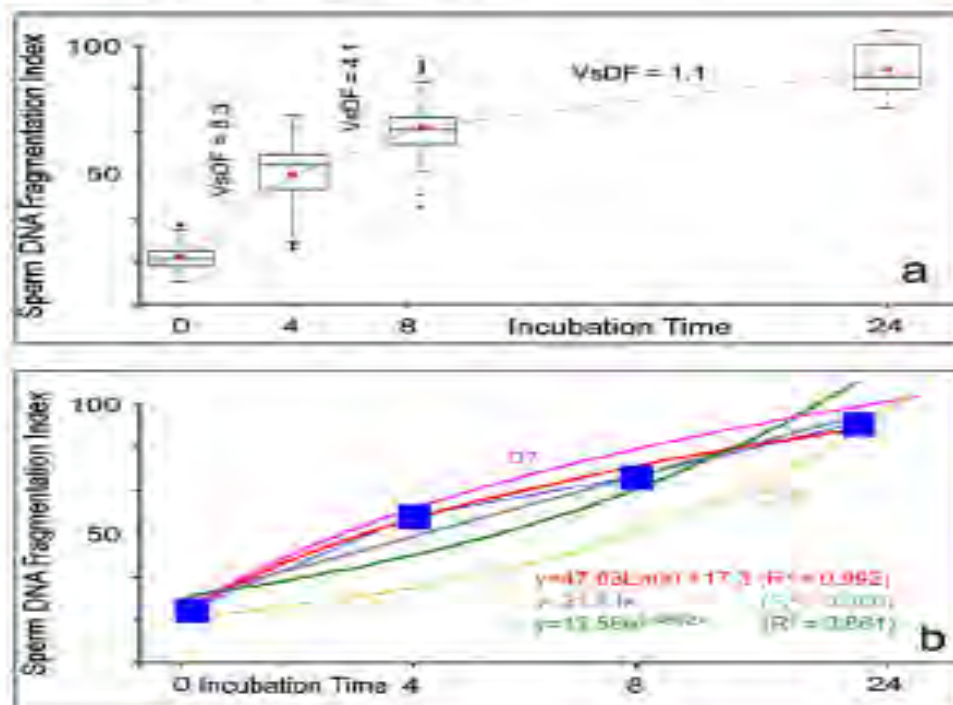
Jaime Gosálvez, M.D.,^a Elva Cortés-Gutierrez, Ph.D.,^b Carmen López-Fernández, Ph.D.,^a José Luís Fernández, M.D.,^c Pedro Caballero, M.D.,^d and Rocio Nuñez, M.D.^d

^aDepartment of Biology, Genetics Unit, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain; ^bDepartment of Genetics, Northwest Research Center of Biology, Mexican National Institute for Health, Monterrey, Mexico; ^cSección de Genética y Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, A Coruña, Spain; and ^dClinica Tambre, Madrid, Spain

Conclusion(s): Sperm DNA fragmentation occurs rapidly after thawing, and it is an important cause of the rapid decline of sperm quality. Thus, the use of sperm samples as quickly as possible after thawing is highly recommended in clinical practice. Different sperm DNA fragmentation dynamics among individuals were observed. (Fertil Steril® 2008; ■:■–■. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine.)

FIGURE 1

(a) Box-and-whisker plots for the sperm DNA fragmentation index observed at different incubation times (37°C) for spermatozoa and the rate for sperm DNA fragmentation observed at each interval. **(b)** Average sperm DNA fragmentation observed at different incubation times (*blue line*) and adjustments for logarithmic (*red line*), linear (*gray line*), or exponential (*green line*) functions. The corresponding equations are shown with the same color pattern. The *pink line* (donor 7) shows the maximum R^2 value for a logarithmic function, and the *light-green line* (donor 15) shows the maximum R^2 value for an exponential function. VsDF = velocity of sperm DNA fragmentation.



**Jaime Gosálvez,
Joaquina de la Torre,
Carmen López-Fernández,
and Laura Pérez-Gutiérrez**
Department of Biology, Genetics
Unit, Universidad Autónoma
de Madrid, Madrid, Spain

**Leonor Ortega,
Pedro Caballero, and
Rocio Nuñez**
Tambre Clinic, Madrid, Spain

Tambre Clinic, Madrid, Spain
**Rocio Nuñez
Pedro Caballero, and
Leonor Ortega**

de Madrid, Madrid, Spain
Unit, Universidad Autónoma
Department of Biology, Genetics
and Laura Pérez-Gutiérrez
Carmen López-Fernández

Research Communication

DNA Fragmentation Dynamics in Fresh Versus Frozen Thawed Plus Gradient- Isolated Human Spermatozoa

Systems Biology in Reproductive Medicine, 56:1–10, 2010

Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.

ISSN: 1939-6368 print/1939-6376 online

DOI: 10.3109/19396360903515430

DOI: 10.3109/19396360903515430

ISSN: 1939-6368 print/1939-6376 online

Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.

Systems Biology in Reproductive Medicine, 56:1–10, 2010

Isolated Human Spermatozoa

Versus Frozen Thawed Plus Gradient-

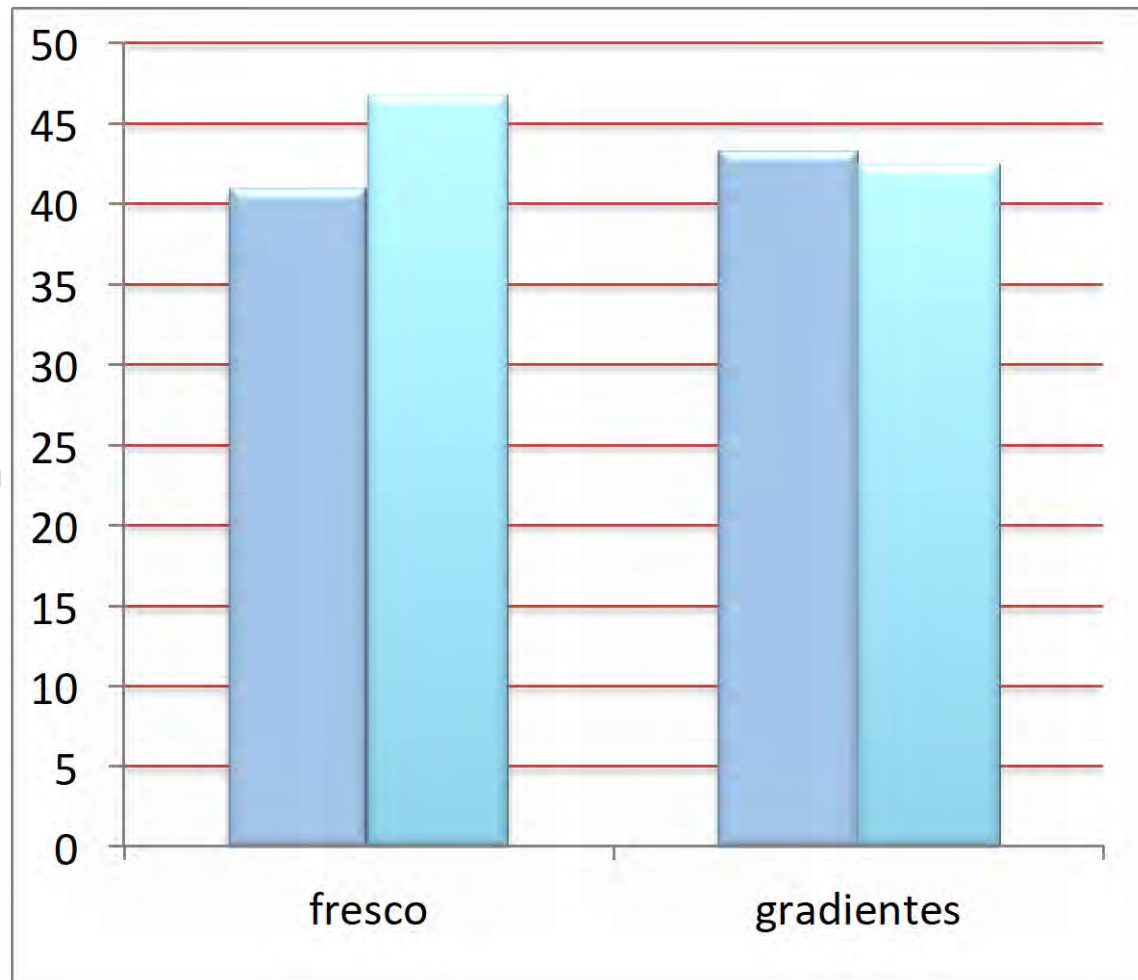
Isolated Human Spermatozoa

Resultados

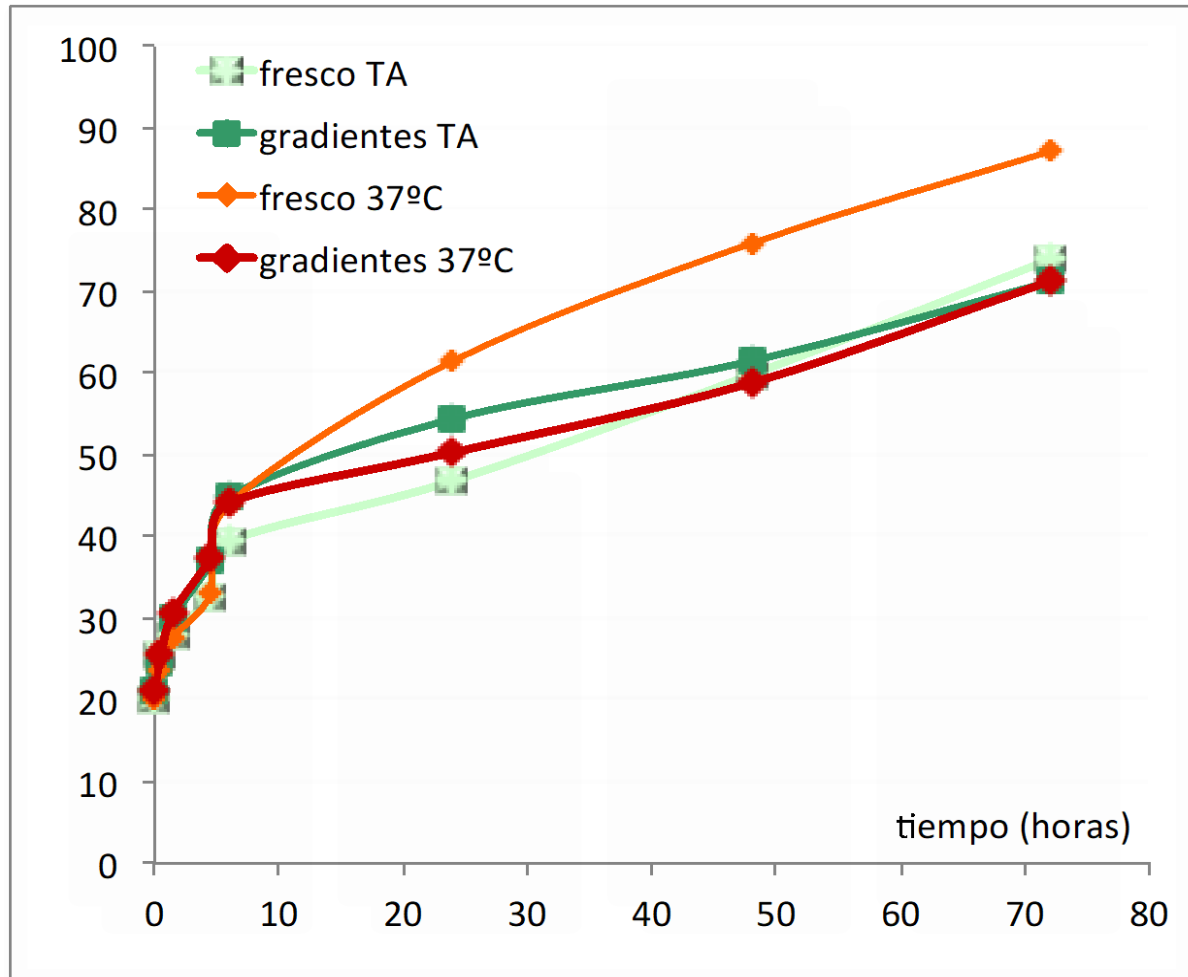
Análisis estático

Desde un punto de vista estático, sin tener en cuenta el momento en el que ha sido procesada la muestra, el resultado de las 480 determinaciones de fragmentación del ADN es de un 43,22 %

No encontramos diferencias significativas entre las muestras en fresco y las capacitadas con gradientes (43,68 vs 42,75 p:0,660) o entre las conservadas a temperatura ambiente y a 37°C (41,93 vs 44,50 p:0,221)



La dinámica de fragmentación de los cuatro grupos estudiados es similar en su comportamiento



ORIGINAL ARTICLE

Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and gradient processed ejaculates in human donors

J. Gosálvez¹, R. Núñez², J. L. Fernández^{3,4}, C. López-Fernández¹ & P. Caballero²

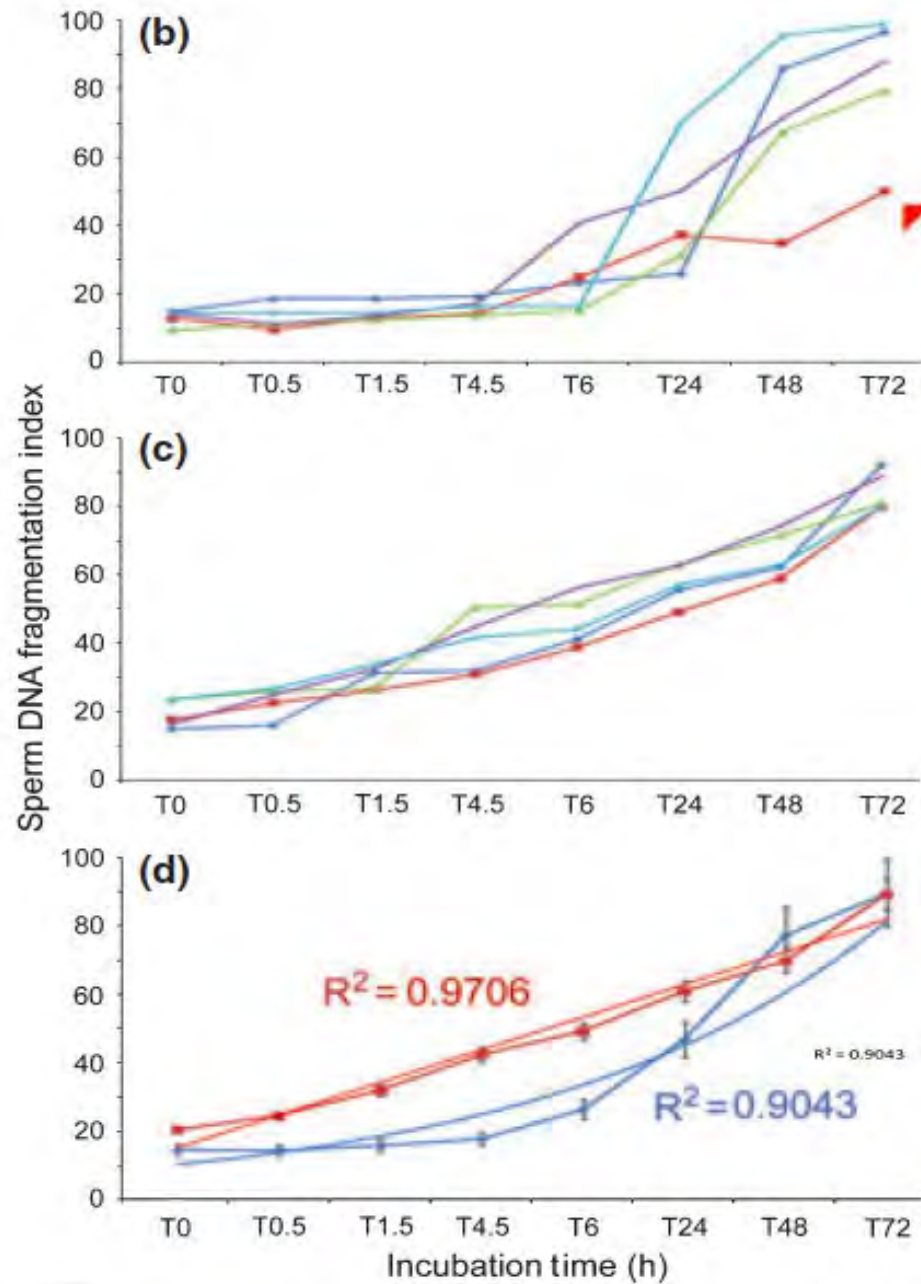
1 Departamento de Biología, Unidad de Genética, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain;

2 Clínica Tambre, C/Tambre 8, Madrid, Spain;

3 INIBIC-Genética, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, As Xubias, A Coruña, Spain;

1 4 Centro Oncológico de Galicia, Avda. Montserrat s/n, A Coruña, Spain

Dynamics of sperm DNA damage



Hindawi Publishing Corporation
Advances in Urology
Volume 2012, Article ID 854837, 12 pages
doi:10.1155/2012/854837

Review Article

Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART

Marlea Di Santo, Nicoletta Tarozi, Marco Nadalini, and Andrea Borini

Tecnobios Procreazione, Centre for Reproductive Health, Via Dante 15, 40125 Bologna, Italy

TABLE 2: (a)–(c) Evaluation of DNA integrity after cryopreservation: description of the experimental design and conclusions.

(a)				
Authors	Test to evaluate DNA integrity	Number of samples	Cryopreservation method	"Does the freezing-thawing procedure induce sperm DNA damage?"
Hamamah et al. [94]	Acridine orange staining and Feulgen-DNA quantitative microspectrophotometry	10	Unspecified	Yes
Spanò et al. [44]	SCSA + Acridine orange staining	19	Equilibration at 37°C, freezing in liquid nitrogen vapour at –80°C and then storage in liquid nitrogen at –196°C	Yes
Hammadeh et al. [95]	Acridine orange staining	59	Computerized slow-stage freezer + static liquid nitrogen vapour	Yes
Donnelly et al. [6]	COMET assay	40	Equilibration at 37°C, freezing in liquid nitrogen vapour at –80°C and then storage in liquid nitrogen at –196°C	Yes
Gandini et al. [96]	Acridine orange staining	19	Equilibration at 37°C, freezing in liquid nitrogen vapour at –80°C and then storage in liquid nitrogen at –196°C	Yes
de Paula et al. [40]	TUNEL assay	77: (i) 30 normozoospermic (ii) 47 oligozoospermic	Use of freezer at –20°C, freezing in liquid nitrogen vapour, then storage in liquid nitrogen –196°C	Yes
Petyim and Choavaratana [43]	Acridine orange staining	50	Freezing with liquid nitrogen vapour + computerized program freezer	Yes
Nagamwuttiwong and Kunathikom [97]	Acridine orange staining	20	Freezing with liquid nitrogen vapour	Yes
Dejarkom and Kunathikom [98]	Acridine orange staining	20	Computerized controlled rate freezing	Yes
Thomson et al. [46]	TUNEL assay	60	Use of programmable freezer	Yes
Thomson et al. [46]	TUNEL assay	320	Sample frozen with and without cryoprotectant by slow-controlled-rate method using a programmable freezer	Yes
Zribi et al. [45]	TUNEL assay	15	Equilibration at 37°C, freezing in liquid nitrogen vapour at –80°C, then storage in liquid nitrogen at –196°C	Yes

Authors	Test to evaluate the DNA integrity	Number of samples	Cryopreservation technique	“Does the freezing-thawing procedure induce sperm DNA damage?”
Høst et al. [100]	Immunoperoxidase detection of digoxigenin-labelled genomic DNA	53: (i) 20 fertile (ii) 33 infertile	Conventional cryopreservation	No
Steele et al. [101]	COMET assay	21: (i) 9 control (ii) 12 with obstructive azoospermia	Freezing in liquid nitrogen vapour	No
Duru et al. [41]	TUNEL assay + annexin V	21	Equilibration at 37°C, freezing in liquid nitrogen vapour at -80°C, then storage in liquid nitrogen at -196°C	No
Isachenko et al. [42]	COMET assay	18	Programmable slow freezing + vitrification	No
Paasch et al. [50]	TUNEL assay + flow cytometric kit for apoptosis	84	Freezing at -20°C, freezing in liquid nitrogen vapor at -100°C, then storage in liquid nitrogen at -196°C	No

ORIGINAL ARTICLE

Correspondence:

Rafael Oliva, Genetics Unit, Department of
Biomedicine, Faculty of Medicine, Casanova 143,
08036 Barcelona, Spain.
E-mail: roliva@ub.edu

Keywords:

cryoinjury, cryopreservation, LC-MS/MS,
proteomics, spermatozoa

Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process

¹O. A. Bogle, ²K. Kumar, ¹C. Attardo-Parrinello, ²S. E. M. Lewis,
³J. M. Estanyol, ⁴J. L. Ballescà and ¹R. Oliva

[Cryobiology](#). 2017 Feb;74:1-7. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.12.002. Epub 2016 Dec 9.

Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells.

[Chatterjee A](#)¹, [Saha D](#)¹, [Niemann H](#)², [Gryshkov O](#)¹, [Glasmacher B](#)³, [Hofmann N](#)¹.

Author information

Abstract

Effective cryopreservation protocols are essential for long-term storage of cells and their subsequent clinical application. Freezing protocols are generally considered as safe; however, putative effects on epigenetic marks have not yet been studied in detail. While post-thaw cell survival rates have been used to evaluate the success of cryopreservation protocols, increasing evidence suggests that freezing may be associated with deviations from the physiological epigenetic marks with putative long-term effects on the cells and/or their derivatives. A better understanding of the underlying mechanisms would be beneficial for improving safety and effectiveness of freezing protocols. The purpose of this review is to provide current information regarding epigenetic alterations (DNA methylation and histone modification patterns) associated with cryopreservation.

REVIEW

Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches



BIOGRAPHY

Abdolhossein Shahverdi is Professor of Embryology and scientific director of the Sperm Biology Group at the Royan Institute in Tehran. His main research interests are fertility preservation, reproductive epigenetic and germ cell biology. With over 20 years' experience in reproductive biology, he has published more than 120 international scientific papers.

Maryam Hezavehei^{1,2}, Mohsen Sharafi^{3,*}, Homa Mohseni Kouchesfahani², Ralf Henkel⁴, Ashok Agarwal⁵, Vahid Esmaeili¹, Abdolhossein Shahverdi^{1,*}

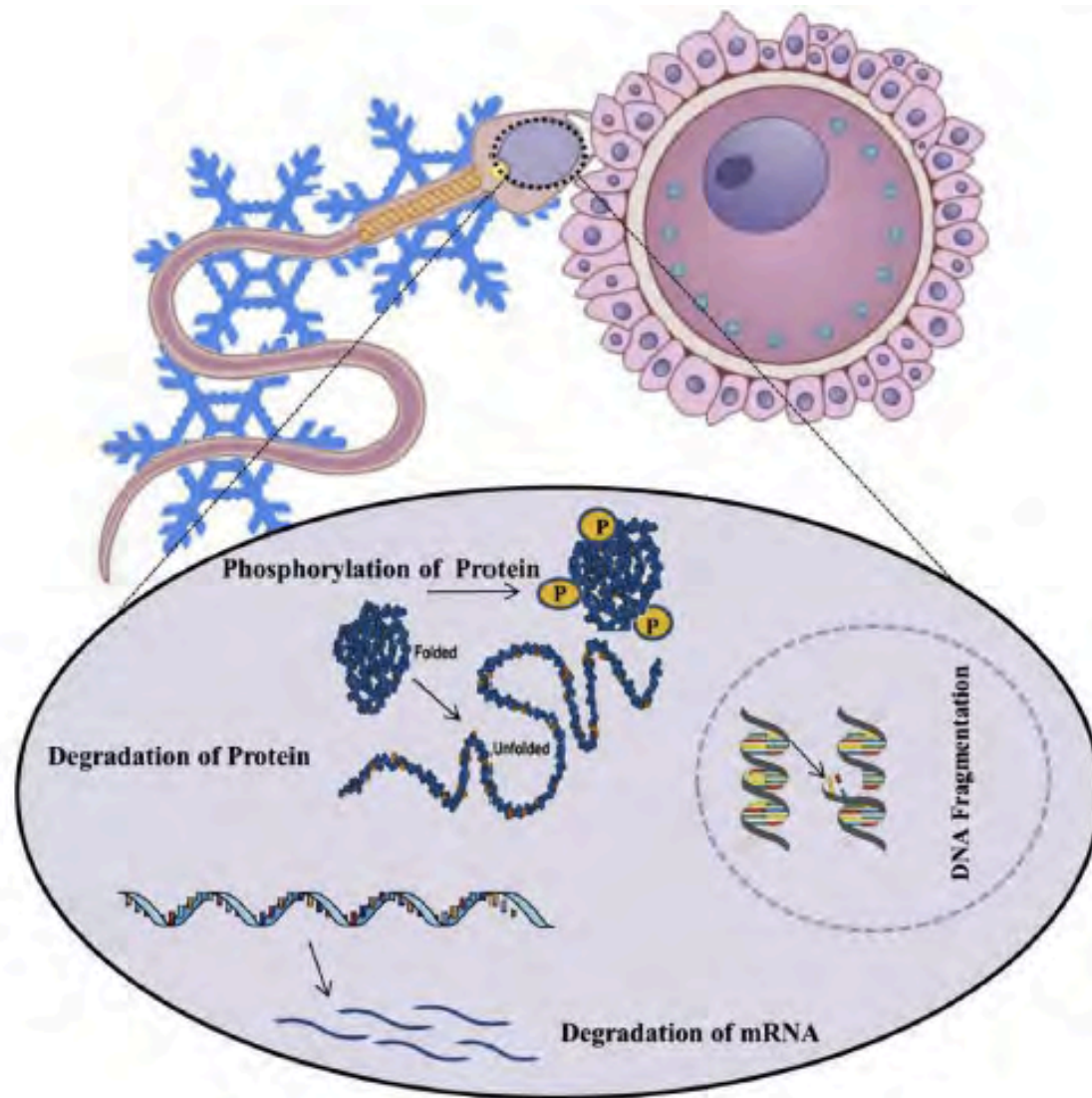


FIGURE 1 A general overview of modification in protein, mRNA and genome of cryopreserved spermatozoa that may affect the paternal contribution and early embryo development.

Efectos de la criopreservación de semen en la descendencia

- La baja calidad de los espermatozoides criopreservados no afecta a la los embarazos tras ICSO (Kuczynski et al., 2001).
- *In a recent study, embryo quality and blastocyst formation were negatively affected by cryopreserved spermatozoa injected into oocytes (Braga et al., 2015).*

ORIGINAL ARTICLE

Correspondence:

Edson Borges, Fertility – Centro de Fertilização Assistida, Av. Brigadeiro Luis Antônio, 4545, São Paulo 01401-002, Brazil.
E-mail: edson@fertility.com.br

Keywords:

blastocyst, embryo, embryogenesis, intracytoplasmic sperm injection cycles, spermatozoa

Received: 30-Oct-2014

Revised: 16-Mar-2015

Accepted: 9-Apr-2015

The negative influence of sperm cryopreservation on the quality and development of the embryo depends on the morphology of the oocyte

^{1,2,3}D. P. A. F. Braga, ^{1,2}A. S. Setti, ¹R. C. S. Figueira, ¹A. Iaconelli Jr. and ^{1,2}E. Borges Jr.

Cuando congelar semen

Si el varón ha tenido dificultades de obtención del eyaculado los días de realización del análisis de semen.

Cuando en el primer seminograma se diagnostica una OATz severa (menos de 1.000.000 espermatozoides/ml), ya que puede derivar en una azoospermia.

Astenozoospermias severas idiopáticas.

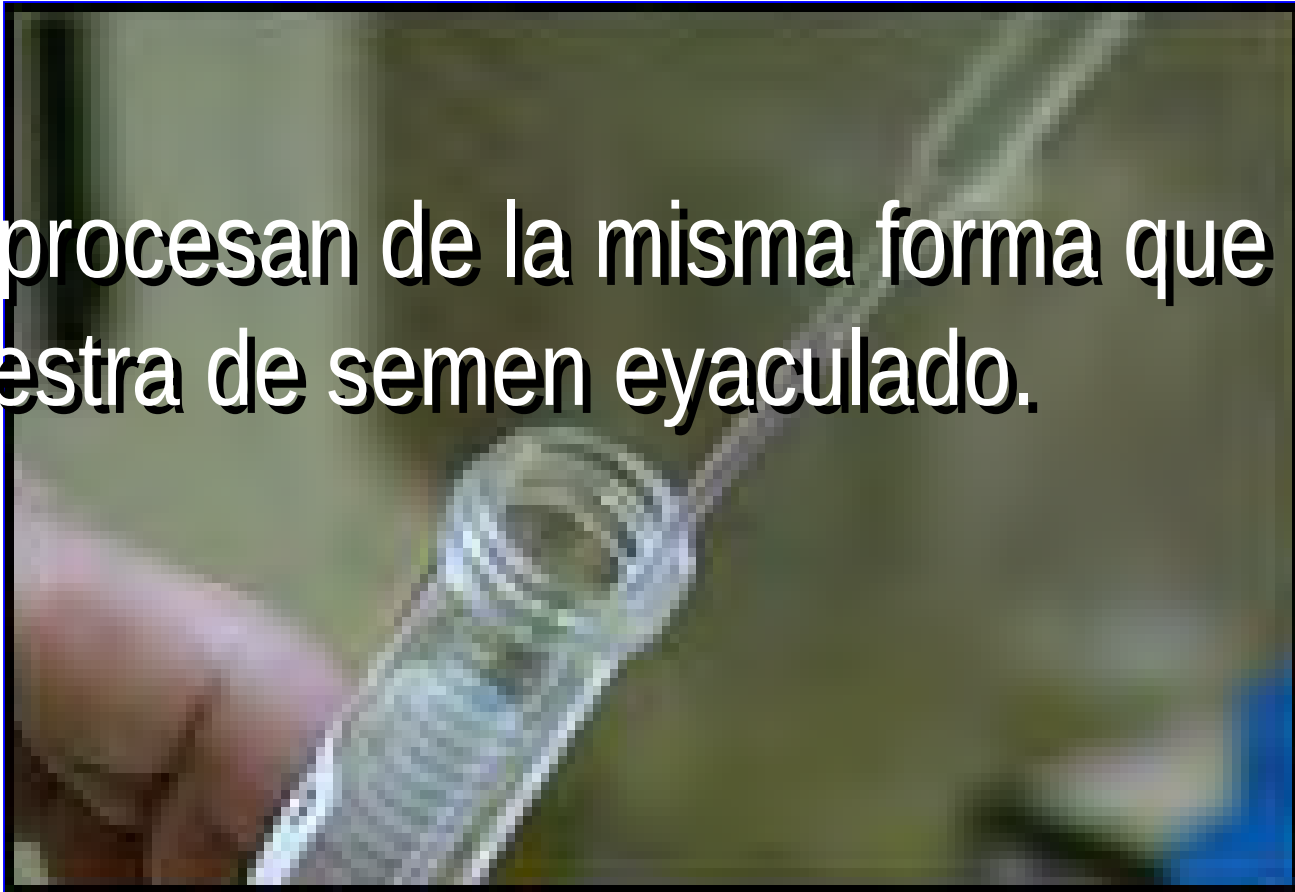
En caso de realizar una prueba de fragmentación que resulte patológica, repetir el análisis y congelar la muestra con menor IF.

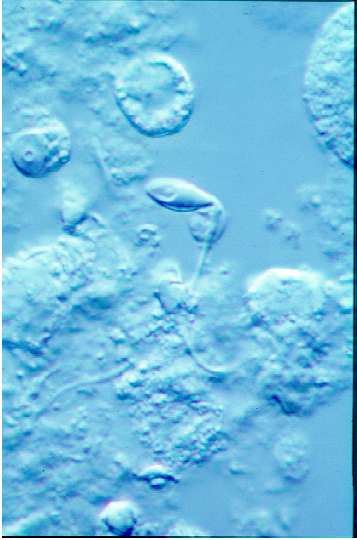


Azoospermia obstructiva

EspERMatozoides epididimarios:

Se procesan de la misma forma que una muestra de semen eyaculado.





Congelación espermatozoides testiculares

Pregnancy after use of frozen-thawed testicular spermatozoa by using intracytoplasmic sperm injection.

Liu et al, 1996

Procesamiento de las biopsias de testículo

a) Condiciones de los
espermatozoides

b) Preparación de las biopsias

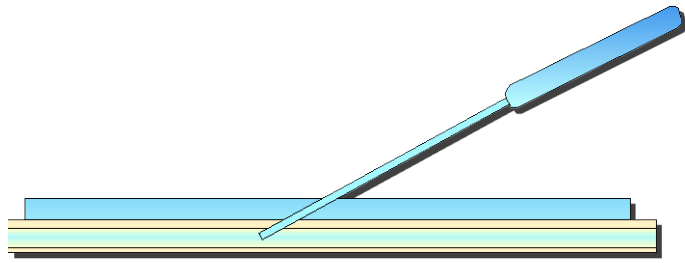


Espermatozoides de testículo



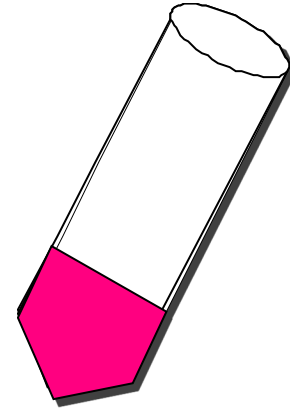
- Aislamiento de tejido testicular
- Incubación previa
- Congelación en píldoras
- Descongelación
- Cultivo en placa de ICSI

Congelación de las biopsias de testículo



Placa Petri

**Centrifugación
2000 r.p.m
5 minutos**

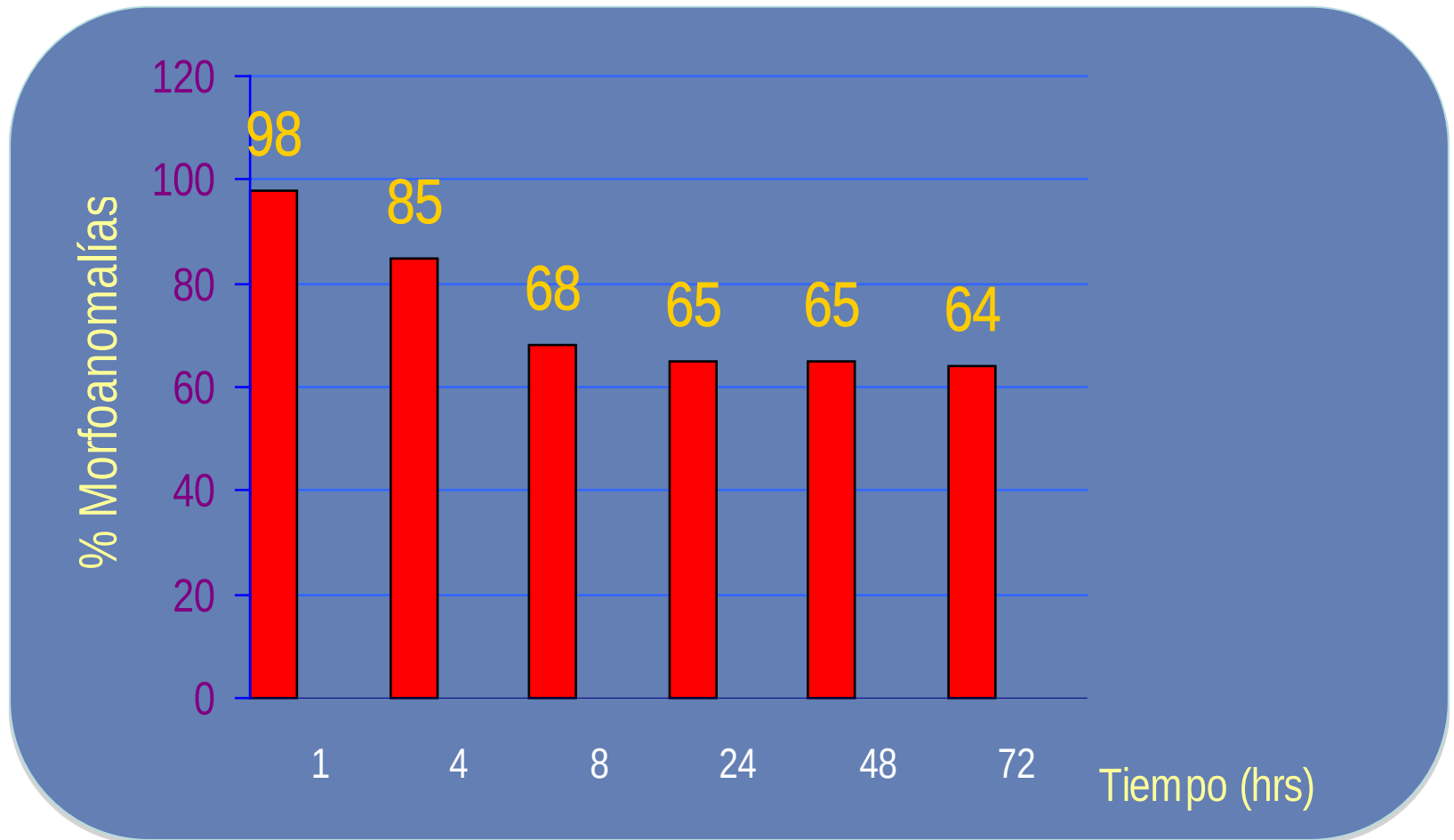


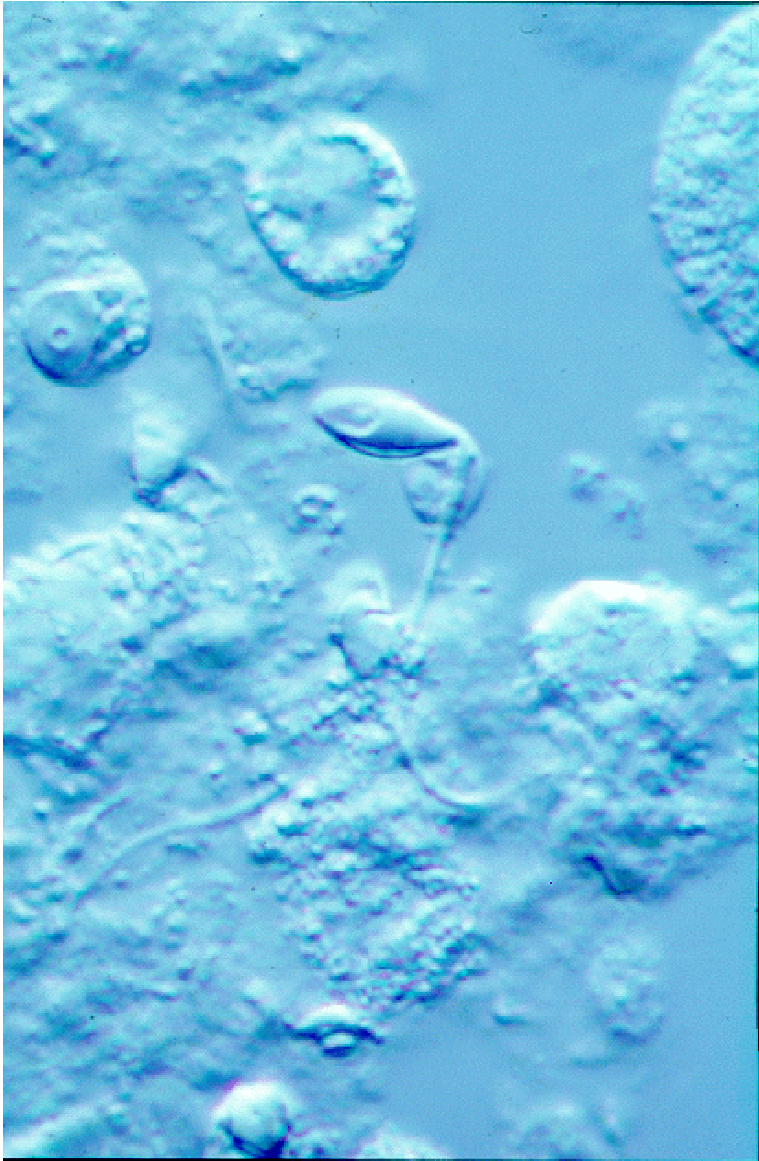
**Incubación
37°C, CO₂,
1 hr.**



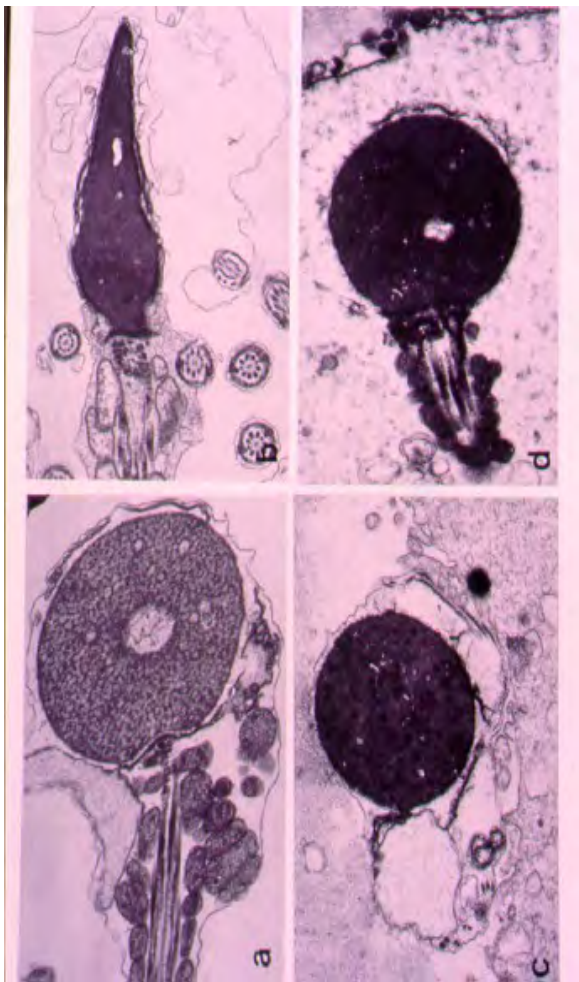
Congelación en píldoras

Morfología espermática a lo largo del tiempo en la suspensión de microgotas.





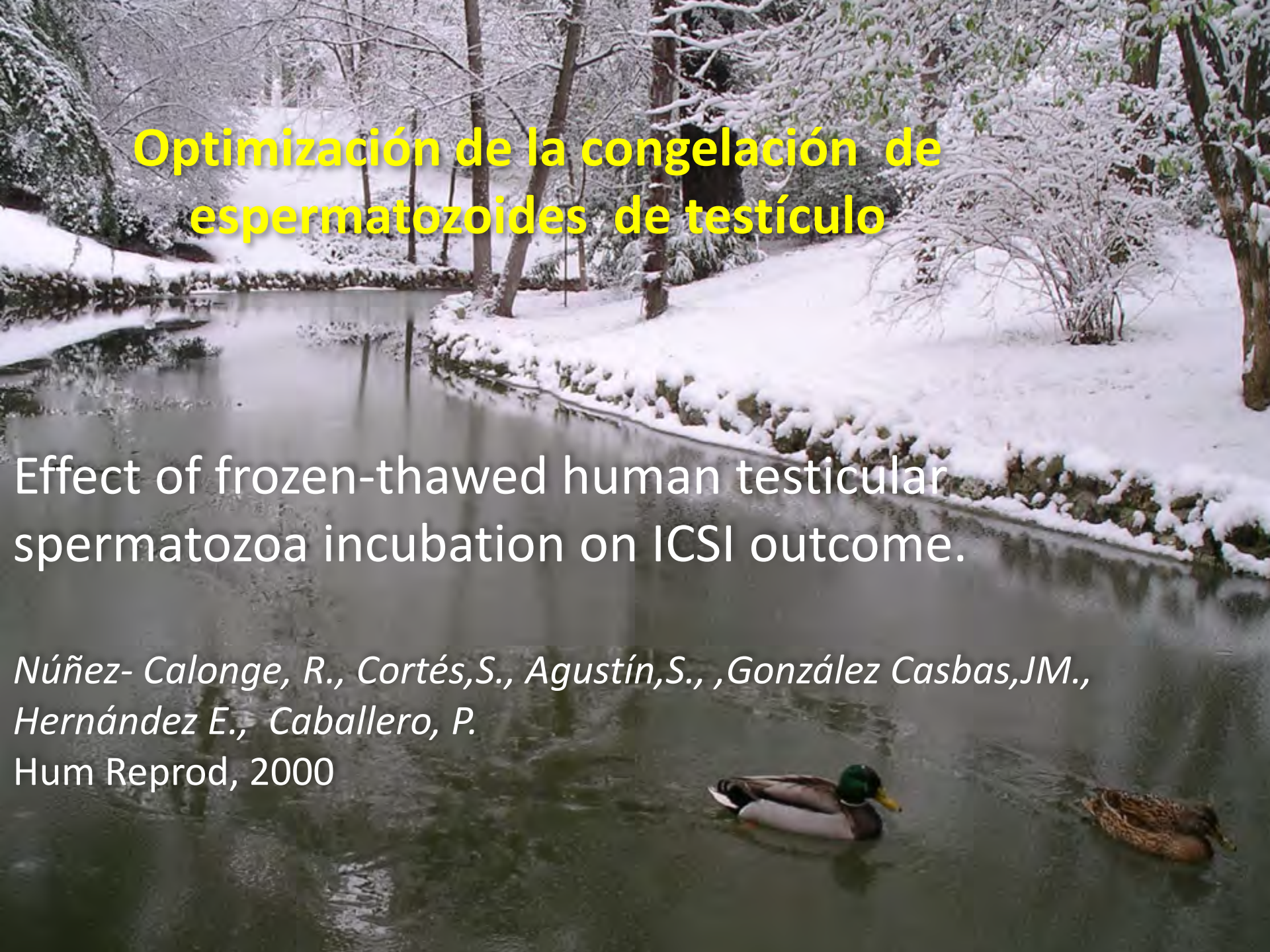
Las morfoanomalías, en realidad, se refieren a espermatozoides inmaduros: presencia de gota citoplasmática y anomalías de S.I.



Light and electron microscopic analysis of human testicular spermatozoa and spermatids from frozen and thawed testicular biopsies.

Nogueira et al
Hum Reprod 14/8, 1999

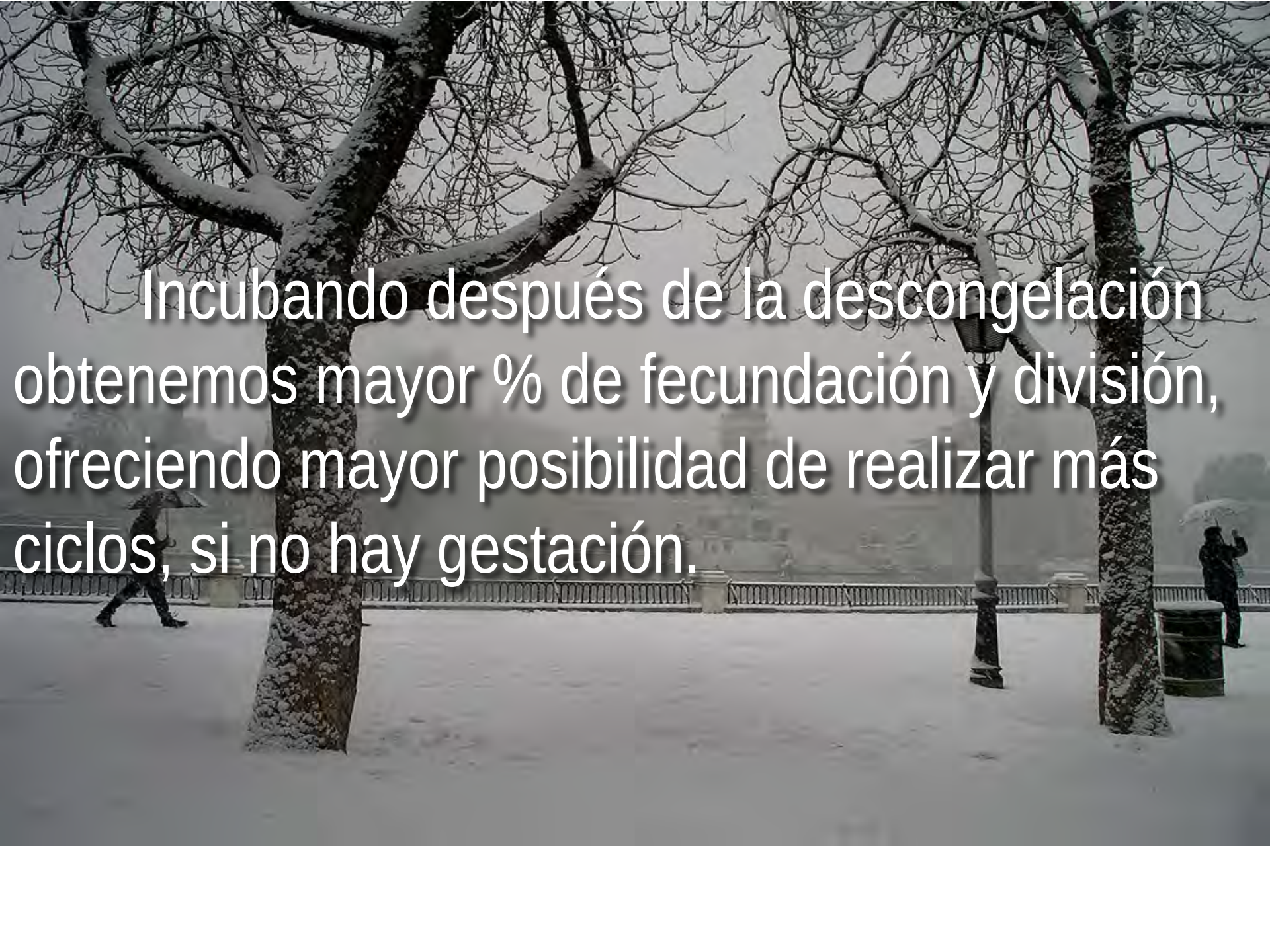
- Con M.E. : lesiones en la cabeza y acrosoma.
- Se afectan más los espermatozoides que espermátides

A serene winter landscape featuring a calm pond surrounded by snow-laden trees and bushes. The scene is peaceful, with the white snow contrasting against the dark trunks of the trees and the still water of the pond. In the foreground, two ducks are swimming in the pond, adding a touch of life to the cold scene.

Optimización de la congelación de espermatozoides de testículo

Effect of frozen-thawed human testicular spermatozoa incubation on ICSI outcome.

*Núñez- Calonge, R., Cortés, S., Agustín, S., , González Casbas, JM.,
Hernández E., Caballero, P.
Hum Reprod, 2000*

A grayscale photograph of a park in winter. The ground is covered in a thick layer of snow. Several large, leafless trees with snow-laden branches stand in the foreground and middle ground. In the background, a low stone wall or fence runs across the frame. Two people are visible: one on the left walking with an umbrella, and another on the right standing near a trash can, also with an umbrella. The overall atmosphere is cold and quiet.

Incubando después de la descongelación
obtenemos mayor % de fecundación y división,
ofreciendo mayor posibilidad de realizar más
ciclos, si no hay gestación.



.... Como en el trabajo
de Nogueira y cols,
mejores resultados si se
congelan
espermatozoides menos
maduros

Clinical Study

**Increased Fertilization Rates after In Vitro Culture of
Frozen-Thawed Testicular Immotile Sperm in Nonobstructive
Azoospermic Patients**

R. Nuñez-Calonge, S. Cortes, M. Gago, P. López, and P. Caballero-Peregrin

Reproduction Unit, CLTNTCA Tambre, Calle Tambre no. 8, 28002 Madrid, Spain

TABLE 2: Motility results with frozen-thawed spermatozoa on the moment of ICSI in both groups (Group I, when spermatozoa reached some kind of motility and Group II, after culture, with the peaked). Values are mean $\pm$ SD.

Time of in vitro culture	Percentage ^a of spermatozoa that were motile	
	Group 1	Group 2
1	2 $\pm$ 2	3.3 $\pm$ 3
2	8.2 $\pm$ 2.5 ^a	4 $\pm$ 5
4	—	11.8 $\pm$ 4
6	—	18.6 $\pm$ 3.6 ^a
8	—	15 $\pm$ 18
12	—	10 $\pm$ 5
24	—	5 $\pm$ 10

^a $P < 0,01$.

TABLE 3: ICSI results with frozen-thawed spermatozoa on the moment of ICSI in both groups (Group I, when spermatozoa reached some kind of motility and Group II, after culture, with the peaked). Values are mean $\pm$ SD.

	Group I ($n = 40$)	Group II ($n = 24$)	<i>P</i>
Fertilization rate (%)	54	72	0.05
Range	42–75	68–92	
Cleavage rate (%)	94	96	NS
Range	60–100	70–100	
Grade 1,2 embryos	2,62	2,7	NS
Clinical pregnancy rate (%)	40	41,6	
	16/40	10/24	NS
Range	20,8	25	
Implantation rate (%)			NS
Deliveries	35	37,5	
	14/40	10/24	

Pautas para la utilización de espermatozoides de biopsia de testículo (I)

- 1. Biopsia de testículo antes del ICSI con A.P.**
- 2. Si hay espermatozoides, congelarlos**
- 3. Si no se encuentran espermatozoides móviles, pero hay suficientes, congelar igualmente la muestra.**

Pautas para la utilización de espermatozoides de biopsia de testículo (II)

4. Congelación en píldoras (selectiva)

5. Descongelar una píldora antes del ICSI

6. Incubación post-descongelación (mínimo 2 horas)

7. ICSI cuando máximo de movilidad

Pautas para la utilización de espermatozoides de biopsia de testículo (I)

Si se utilizan espermatozoides de testículo en fresco para ICSI:

1. Procesar la muestra e incubar al menos dos horas (maduración)
2. Incubar en microgotas
3. Congelar el resto de la muestra

GRACIAS

rocioncalonge@gmail.com