

## PREZERVACIJA SPERMATOZOIDA

Andelka Hedrih

### SAŽETAK

U cilju povećanja procenta uspješnih koncepcija primenom veštačke oplodnje koriste se različite tehnike prezervacije sperme. Trajno čuvanje (decenijama) za sada je moguće krioprezervacijom tečnim azotom. Kratkotrajna prezervacija podrazumeva tečnu prezervaciju, i mikroinkapsulaciju različitim polimerima (poliuretani, kalcijum i barijum alginat). Spermatozoidi različitih vrsta su različito osetljivi na proces zamrzavanja i odmrzavanja. Bez obzira na vrstu, dešava se oštećenje ćelijskih membrana, DNK, smanjuje se procenat pokretnih i vijabilnih spermatozoida. Postoje različiti protokoli zamrzavanja koji se standardizuju za svaku vrstu. Kvalitet odmrznute sperme zavisi od primenjenog protokola i kvaliteta sperme pre zamrzavanja i varira i u okviru iste jedinice. Kada je u pitanju humani materijal pokazalo se da postepeno hlađenje i odmrzavanje više nije imperativ. Suština mikroinkapsulacije spermatozoida je da se polimer koji je na sobnoj temperaturi u čvrstom stanju, na temperaturi tela otopi i oslobodi spermatozoide. Dizajniranjem karakteristika membrane mikrokapsule moguće je ostvariti željenu dinamiku otpuštanja spermatozoida. Sistemi za kontinuirano oslobađanje mikroinkapsuliranih spermatozoida u reproduktivnom traktu (kapsule od celuloza sulfat-poli-dialildimetil amonijum hlorida, kalcijum alginat sa hidroksipropiletilcelulozom) se za sada ne primenjuju na ljudima.

**Ključne reči:** spermatozoidi, prezervacija, inkapsulacija

### UVOD

#### Značaj prezervacije

Prezervacija sperme je naročito dobila na značaju širokom primenom veštačke oplodnje u stočarstvu i svinjogojstvu, kao i u humanoj populaciji. U humanoj populaciji prezervacija sperme se primenjuje u lečenju steriliteta, ali i pre sprovođenja antikancerske terapije, pre operacije prostate ili testisa, vazektomije, kod osoba koje se bave zanimanjima povezanim sa dejstvom hemikalija, radijacije ili ekstremne toplote (1). Iz praktičnih razloga, nastale su "banke sperme" u kojima se sperma čuva da bi se upotrebila u pogodnom trenutku. Za sada, čuvanje sperme u bankama sperme preventivno podrazumeva primenu tehnologije krioprezervacije. S obzirom da se prilikom zamrzavanja i odmrzavanja spermatozoidi oštećuju, za veštačku oplodnju potrebna je veća koncentracija zamrznutih spermatozoida nego kada se koristi sveža sperma (2). Spermatozoidi različitih vrsta su različito osetljivi na zamrzavanje i odmrzavanje (3).

Iz tih razloga, traga se za alternativnim tehnikama prezervacije.

### ABSTRAKT

#### Sperm preservation

In order to increase rate of successful conceptions by using artificial insemination procedures, various methods of semen preservation are used. Long-term preservation (for decades) is so far possible by cryopreservation in liquid nitrogen. Short-term preservation means liquid preservation and microincapsulation by using various polymers (polyurethans, calcium and barium alginates). Spermatozoa of various types differ in sensitivity to the process of freezing and unfreezing, but some damage to cell membranes, DNA and a reduction in the percentage of viable spermatozoa always happens. There are various freezing protocols standardized for each species. Quality of unfrozen semen depends on the protocol applied and of pre-freezing semen quality and various with the same being. Research has shown that slow cooling and unfreezing is no longer an imperativ for human semen. Semen microincapsulation is based on the fact that polymer which is in a solid state at room temperature melts when it reaches body temperature thus releasing the semen. By designing properties of microcapsule membrane, dynamics of semen release can be controlled. Systems for continual release of microencapsulated spermatozoa in the reproductive tract (capsules made of cellulose sulfat-poly-diallyldimethyl ammonium chlorid, calcium alginat with hydroxypropyletilcellulose.... ) have so far not been used in humans.

**Keywords:** spermatozoa, prevention, encapsulation

### METODE PREZERVACIJE

#### Krioprezervacija

Metode prezervacije mogu biti dugotrajne i kratkotrajne. Metoda dugotrajne prezervacije je krioprezervacija. Za kratkotrajnu prezervaciju se može koristiti tečna prezervacija i mikroinkapsulacija. Krioprezervacija sperme počela je široko da se koristi od 1950. godine. Glavne prednosti zamrznute sperme nad svežom su mogućnost čuvanja decenijama, prenosa pomoću manjih kontejnera sa tečnim azotom, koji su otporni na transport, i mogućnost upotrebe u bilo kom trenutku. Međutim, izvestan procenat spermatozoida ne preživi odmrzavanje ili postane nefunkcionalan. Cilj svih protokola za zamrzavanje sperme je sprečavanje letalnog formiranja kristala leda u ćeliji, kontrola velikih promena ćelijskog volumena i smanjenje oštećenja membrana koja nastaju kao posledica izazvane temperaturom fazne promene. Zbog građe spermatozoida i postojanja različitih kompartmana unutar spermatozoida, veoma je teško ispuniti sve uslove. Prilikom velikih temperaturnih promena, spermatozoidi su izloženi oštećenju slobodnim radikalima kiseonika.

S ciljem da se poveća procenat spermatozoida koji prežive proces odmrzavanja u većini protokola ejakulatu se dodaju različiti puferisani rastvarači koji sadrže supstancu bogatu energijom - glukozu ili fruktozu, krioprotektori (najčešće glicerol, holesterol se može koristiti za stabilizaciju membrana spermatozoida) kao i različita dinamika temperaturnih promena.

Posle rastvaranja krioprotektora intracelularna voda izlazi iz ćelije, a glicerol ulazi u ćeliju. Brzina hlađenja je otprilike 20°C u minutu. Pri tom nastaje brzo formiranje ekstracelularnih kristala i brzo se povećava koncentracija supstanci koje okružuju spermatozoide. Krioprotektori imaju za cilj da smanje osmotski šok kojem je izložena ćelija prilikom zamrzavanja i odmrzavanja. Glicerol smanjuje tačku zamrzavanja intracelularne vode, tako da ćelija ostaje nezaleđena i ostaje ohlađena na temperaturi značajno ispod prave tačke smrzavanja. Kao odgovor na povećanu osmotsku koncentraciju ekstracelularno, intracelularna voda teži da napusti ćeliju. Smrzavanjem ekstracelularne vode nastaje egzotermna reakcija koja može oštetiti ćeliju što se smanjuje brzim hlađenjem okoline potapanjem u tečni azot. U zamrznutom stanju postoji minimalno molekularno kretanje. Prilikom odmrzavanja spermatozoidi su izloženi sličnim brzim promenama volumena i propustljivosti ćelijske membrane. Otapanjem ekstracelularna voda postaje tečna, ulazi u ćeliju, ćelija povećava svoj volumen; povećanjem temperature glicerol napušta ćeliju, dolazi do redistribucije membranskih proteina i lipida ćelije u cilju ponovnog vraćanja ćelijskih funkcija.

Osetljivost spermatozoida na smrzavanje i odmrzavanje zavisi od vrste, kvaliteta spermatozoida, kao i od postupka krioprezervacije.

U *in vitro* uslovima spermatozoidi, koji su bili zaleđeni, brže se vezuju za epitelne ćelije jajovoda, ali se i brže od njih odvajaju u odnosu na sveže spermatozoide kod kojih su oba procesa postepena. Ovo se može delimično prevazići dodavanjem semene plazme posle odmrzavanja (5).

Postoje različiti protokoli i metode krioprezervacije (suvi led, *dry shipper one-step*, *dry shipper two-step*, tečni azot, para azota). Protokoli odmrzavanja se takođe razlikuju. Neki podrazumevaju da se epruvete posle vađenja iz tečnog azota drže na sobnoj temperaturi (25°C) 30-45 minuta (3), a neki brzo zagrevanje na 37°C (6).

Kvalitet odmrznutih spermatozoida zavisi od protokola ali i od prvobitnog kvaliteta spermatozoida. Posle zamrzavanja azotnom parom stopa obnove pokretljivosti spermatozoida je veća kako za spermatozoide normospermičnih, tako i za

spermatozoide oligospermičnih muškaraca. Bolji stepen oporavka pokazuju spermatozoidi normospermičnih.

U cilju zaštite spermatozoida prilikom procesa zamrzavanja i odmrzavanja, konvencionalno se koriste različiti krioprotektori: HSPM, TEST-*yolk* ili glicerol, Glycerol-*egg yolk* citrate. Prilikom zamrzavanja i odmrzavanja humanih spermatozoida smanjuje se procenat spermatozoida sa normalnom morfologijom i intaktnom hromatinskom strukturom, u poređenju sa nativnom spermom, bez obzira da li se kao krioprotektor koristi HSPM ili TYB, mada TYB značajno bolje štiti hromatin i morfologiju spermatozoida (7), dok spermatozoidi zamrznuti sa HSPMa pokazuju bolji motilitet, brzinu i oporavak od spermatozoida zamrznutih sa TEST-*yolk* ili glicerolom (8).

Uspešna krioprezervacija humanih spermatozoida je moguća i bez upotrebe krioprotektanata - procesom vitrifikacije (6). Proces vitrifikacije, takođe, sprečava formiranje intracelularnog leda i visoke koncentracije soli tokom procesa zamrzavanja i odmrzavanja. Ceo proces traje nekoliko sekundi. Veoma brzo rashlađivanje pre stavljanja u tečni azot (i do 7.2 x 10<sup>5</sup> °C/min) i veoma brzo zagrevanje posle vađenja iz tečnog azota (na 37°C) ne dozvoljavaju da se formiraju intracelularni kristali leda. Posle otapanja, pokretljivost spermatozoida, fertilizaciona sposobnost, DNK integritet spermatozoida je uporediv sa tehnikom u kojoj se primenjuje rashlađivanje pre spuštanja u tečni azot i postepeno hlađenje (150-250°C/min). Prihvatljivi su različiti rasponi stepena rashlađenja.

Oštećenje humanih spermatozoida dešava se, uglavnom, za vreme odmrzavanja i pripisuje se smanjenoj antioksidativnoj zaštiti za vreme hlađenja i/ili strukturnim oštećenjima citoskeleta i/ili antioksidativnim enzimima. Pri sporom zamrzavanju formira se led, te je neophodno koristiti visoke koncentracije krioprotektora koji mogu imati toksični efekat. To se izbegava prethodnim rashlađenjem, korišćenjem manje koncentracije krioprotektora uz istovremeno povećanje brzine zamrzavanja i odmrzavanja. Za uspešan proces vitrifikacije važan je procenat intracelularne vode. Vitrifikacija velikih ćelija sa velikim sadržajem slobodne intracelularne vode (oocite, embrionalne ćelije) bez upotrebe krioprotektora, tako da ćelije ostanu u životu, za sada nije moguća. Zagrevanje male količine uzorka, velika viskoznost medijuma za zamrzavanje, velika brzina zagrevanja, male ćelije sa niskim sadržajem vode i veliki stepen kompartmanizacije, su skup uslova koji bi trebalo da omoguće ćelijama da u velikoj meri odole devitifikaciji (6).

Spermatozoide miša moguće je sačuvati istovremenim zamrzavanjem (na  $-80^{\circ}\text{C}$ ) i desikacijom. Ako sušenje traje 5 min uz dodatak trehaloze moguće je čuvati mišije spermatozoide do tri meseca na  $4^{\circ}\text{C}$ , i dobiti živo potomstvo ICSI tehnikom (procenat implantacije bio je 48% a živih fetusa 5%) (9).

### ***Tečna prezervacija***

"Do 1992 istraživači su pokušavali da očuvaju spermatozoide na sobnoj temperaturi ili na  $0-5^{\circ}\text{C}$  ili  $10-15^{\circ}\text{C}$  pomoću rastvora različitog sastava (sintetski pufri kombinovani sa šećerima ili žumancem jajeta ili njegovim frakcijama, mlekom različitih vrsta, glicinom i drugim supstancama). Nezavisno od rastvarača, njegove koncentracije i temperature čuvanja, spermatozoidi su propadali veoma brzo. Fertilizacionu sposobnost spermatozoida bilo je moguće očuvati najviše 10 dana i to posle intrauterine inseminacije" (10).

Na  $5^{\circ}\text{C}$ , u hipoosmotskom rastvoru Tris trehaloze moguće je održati veliki procenat spermatozoida pokretnim (oko 94%) do 15 dana (11). Tečna prezervacija spermatozoida svinje pomoću Modena rastvora (15% (v/v), u kojem cistein poboljšava vijabilitet i oplodnu sposobnost spermatozoida moguća je na  $10^{\circ}\text{C}$  do 22 dana (12).

Spermatozoidi miša se mogu čuvati nedelju dana na sobnoj temperaturi u KSOM-BSA hiperosmolarnom medijumu (800 mOsmol), a na  $-20^{\circ}\text{C}$  do tri meseca i zadržati sposobnost oplodnje ICSI tehnikom (13).

### ***Desikacija***

Eksperimenti Meyers-a ukazuju da je moguće sačuvati spermatozoide i spermatogonije rezus majmuna desikacijom. Preživljavanje životinjskih ćelija u uslovima dehidracije zavisi od njihove sposobnosti da tokom procesa dehidracije akumuliraju disaharde unutar citoplazme, pre svega trehalozu (14).

U suvom stanju ćelije mogu da podnesu i znatno više i niže temperature. Pri procesu desikacije molekule vode zamenjuju molekuli trehaloze. Trehaloza menja temperaturu faznog prelaza membranskog dipalmitoilfosfatidil holina. Molekuli vode se pri procesu dehidracije zamenjuju molekulima trehaloze do koncentracije koja omogućava vitifikaciju - nastanak staklastog stanja koje, zbog svoje viskoznosti, blokira sve hemijske reakcije u kojima je neophodna difuzija (15). U procesu postepenog smrzavanja i isušivanja intracelularna voda se različito ponaša. Prilikom postepenog smrzavanja osmotskim mehanizmima voda se povlači iz citoplazme, ali ipak ostaje mala količina vezane vode

koja se ne zaleđuje, tako da deo proteina i lipida ostaje u hidratisanom stanju. Prilikom procesa isušivanja dolazi do uklanjanja i ove vezane vode, što za posledicu ima velike biofizičke promene proteina i lipida. Preliminarni rezultati ukazuju na to da je spermatogonije moguće desikovati na manje od 3g po gramu vode, a da one posle rehidracije zadrže vijabilnost. Ova metoda je zamišljena da bude alternativa krioprezervaciji, ali za sada ne daje dobre rezultate u prezervaciji spermatozoida (14). Upotrebom zrelih smrznutih - desikovanih spermatozoida miša, zeca i pacova (nepokretnih i nevijabilnih, ali ultrastrukturno intaktnih) primenom ICSI tehnike razvija se živo potomstvo (Kusakabe et al, 2001 po 14).

### ***Inkapsulacija***

Mikroinkapsulacija spermatozoida različitim polimerima omogućava njihovu kratkotrajnu prezervaciju.

U cilju zaštite spermatozoida od nepovoljnih uslova u uterusu (pH, leukociti koji fagocituju spermatozoide) i njihovog produženog oslobađanja u dovoljnoj koncentraciji u reproduktivnom traktu ženske jedinke, pribeglo se njihovoj inkapsulaciji. Da bi inkapsulisani spermatozoidi ostali vijabilni, neophodno je da budu ispunjeni određeni uslovi od strane polimera koji se koristi za inkapsulaciju: polimer mora da bude netoksičan, inertan, hidrofilan, permeabilan za gasove i male molekule (do 5000 D) i relativno nepropustljiv za makromolekule, kao i da obezbedi stalan i jednak pH. Na temperaturi tela ( $37^{\circ}\text{C}$ ), polimer mora da pređe u tečno stanje, a da na nižim temperaturama postoji u polučvrstom ili čvrstom stanju; zatim mora biti krioprezervabilan i aplikabilan. Poroznost polimera i njegova koncentracija utiču na vijabilnost spermatozoida (3). Prema Unitet States Patent 4840891 objavljenom 1989-te, u ove svrhe korišćen je u vodi nerastvorljivi, temperaturno reverzibilni hidrofilni polimer - poliuretan (RL39-41, RL39-110, RL39-111, RL39-114, RL39-117, RL39-118). Mešavina polimera, spermatozoida i medijuma se pripremi na  $37-39^{\circ}\text{C}$ , a zatim postepeno ohladi na sobnu temperaturu ( $22^{\circ}\text{C}$ ) ili dalje na  $4-5^{\circ}\text{C}$  ( $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). Brzina hlađenja zavisi od porekla spermatozoida (spermatozoide govečeta potrebno je sporije hladiti). Prma ovom patentu, sporije hlađenje i sporije zagrevanje obezbeđuju veći procenat pokretnih spermatozoida. Inkapsulisani spermatozoidi su potpuno imobilisani u polimeru i mogu se transportovati ili čuvati na niskim temperaturama ( $4^{\circ}\text{C}$ ) do trenutka upotrebe. Prilikom hlađenja polimer očvrstne i spermatozoidi ostaju nepokretni sa

minimalnim metaboličkim zahtevima, da bi prilikom prelaska polimera u tečno stanje (na 37°C) vratili svoju pokretljivost. Vidljivu pokretljivost (golim okom pod mikroskopom) spermatozoidi gube na temperaturi od 7°C (tada je polimer potpuno u gel stanju), a njihova pokretljivost se ponovo može primetiti zagrevanjem polimera na 20°C (polimer je u semigel stanju). Pokretljivost se najpre vraća spermatozoidima bliže periferiji kapsule. Vreme faznog prelaza iz čvrstog u tečno stanje (sa 4°C na 37°C) za korišćene polimere koncentracije 4% i 8% je 120 minuta. Vreme faznog prelaza iz tečnog u čvrsto stanje je 15 min (3).

Pokazalo se da 60% ovako inkapsulisanih spermatozoida miša, govečeta i čoveka zadržava vijabilnost 10 dana na temperaturi od 10°C, a 80% vraća pokretljivost posle prelaska polimera u tečno stanje. Posle 14 dana, procenat pokretljivih spermatozoida bio je 48% (3).

Tehnika elektrostatičke ekstruzije se široko primenjuje za inkapsulaciju ćelija alginatom. Alginat je biljni polimer, lako topljiv na telesnoj temperaturi (37°C). Korišćenjem ove tehnike i barijum alginata mogu se kratkotrajno čuvati spermatozoidi svinje (Conte et al, 1999. po 16). Za razliku od kalcijuma koji podstiče, barijum inhibira prevremenu kapacitaciju. Spermatozoidi svinje mogu se inkapsulisati i kalcijum alginatom umreženim polikatjonima. Podešavanjem debljine kapsule može se kontrolisati vreme oslobađanja spermatozoida, a mešavinom kapsula različite debljine kontroliše se vreme i tempo oslobađanja. Mikroinkapsulacija spermatozoida svinje alginatom, poboljšava im trajnost i fertilitet in vivo. Posle 3 dana čuvanja mikroinkapsulisanih spermatozoida svinje na 5°C, i osmočasovne inkubacije na 37°C, motilitet inkapsulisanih spermatozoida je bio značajno veći u odnosu na neinkapsulisane. Posle četiri dana čuvanja mikroinkapsulisana i neinkapsulisana sperma je upotrebljena za veštačku oplodnju. Nije bilo značajne razlike u stepenu koncepcije, oprasivanja i veličine okota (17). Posle krioprezervacije kalcijum alginatom inkapsulisani humani spermatozoidi imaju manju pokretljivost, ali veći vijabilitet (mereno *Spermatozoa viability kitom*) u odnosu na standardne protokole (18).

U cilju kontrolisanog oslobađanja sperme pri veštačkoj inseminaciji govečeta razvijene su dve strategije mikroinkapsulacije kalcijum alginat- ili CS-pDADMAC. CS-pDADMAC- kapsule se razlaže posle 72 sata dodavanjem prečišćene celulaze ili kapsula kalcijum alginata ispunjenih celulazom. Mikroinkapsulisani spermatozoidi mogu da se zamrzavaju (19).

Dodavanjem suspenzije nastale mešanjem hidroksipropilmetilceluloze i kalcijum hlorida svežem ejakulatu svinja u vodeni rastvor natrijum alginata, nastaju inkapsulisani spermatozoidi. Podešavanje debljine kapsule se može postići različitim koncentracijama kalcijum hlorida. Različita debljina kapsule ima uticaj na mehaničke karakteristike kapsule i dinamiku otpuštanja spermatozoida iz kapsule. Pokretljivost i srednja brzina inkapsulisanih spermatozoida manja je od istih parametara svežih (20).

## ZAKLJUČAK

Savremeni koncepti očuvanja vrste i reprodukcije stvorili su potrebu za prezervacijom sperme kao strateškim resursom za veštačku oplodnju. U humanoj populaciji procenat uspenosti veštačke oplodnje je oko 30%. Trajno čuvanje (decenijama) za sada je moguće krioprezervacijom tečnim azotom. I pored brojnih prednosti, tehnika krioprezervacije ima i svoje nedostatke, a glavni nedostatak je neizbežno oštećenje spermatozoida koje nastaje pri odmrzavanju. Spermatozoidi različitih vrsta su različito osetljivi na proces zamrzavanja i odmrzavanja, te se protokoli razlikuju, u zavisnosti od vrste. Kvalitet odmrznute sperme zavisi i od kvaliteta sperme pre zamrzavanja i varira i u okviru iste jedinice. Kada je u pitanju humani materijal pokazalo se da postepeno hlađenje i odmrzavanje više nije imperativ, da spermatozoidi čoveka mogu da podnesu širi temperaturni raspon, a da zadrže oplodni potencijal. Krioprotektori deluju, uglavnom, tako što snižavaju tačku zamrzavanja intracelularne vode ili stabilizuju membrane. Jedna od mogućnosti krioprezervacije je i istovremena desikacija.

Kratkotrajna prezervacija podrazumeva tečnu prezervaciju i mikroinkapsulaciju različitim polimerima (poliuretani, kalcijum i barijum alginat). Postoje i sistemi mikroinkapsulisanih spermatozoida za njihovo kontinuirano oslobađanje u reproduktivnom traktu (što povećava procenat uspešnih veštačkih oplodnji), ali se oni za sada ne primenjuju na ljudima. Dizajniranjem karakteristika membrane mikrokapsule moguće je ostvariti željenu dinamiku otpuštanja spermatozoida. Cilj primene svih ovih tehnika je povećanje procenta uspešnih koncepcija primenom veštačke oplodnje.

Možda je alternativa tehnici krioprezervacije spermatozoida dizajniranje odgovarajuće mikrokapsule koja će omogućiti njihovo čuvanje na sobnoj temperaturi ili na +4°C.

## SKRAĆENICE

- CS-pDADMAC - celuloza sulfat-poli-dialildimetil amonijum hlorid
- HSPM - human sperm preservation medium
- H-TALP medijum - HEPES-TALP medijum: (HEPES- 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sulfonska kiselina; TALP -Tyrode's albumin lactate pyruvate)
- ICSI - intracitoplazam sperm inection
- KSOM-BSA medijum - potassium simplex optimized medium with amino acids and bovin serum albumin
- TYB - TEST yolk buff

## LITERATURA:

1. Anger TJ, Gilbert RB, Goldstein M. Cryopreservation of Sperm: Indications, Methods and Results. *J Urol* 2003; 170(4): 1079-84.
2. Marcus-Braun N, Braun G, Potashnik G and Harvardi I. Effect of cryopreservation on quality and fertilization capacity of human sperm. *E. J & Gyn and Reprodu Biol* 2004; 116(1): 63-6.
3. Van BJ. US4840891 (1989).
4. Celeghini CCE, de Arruda PR, de Andrade CFA, Nascimento J, Raphael FC Rodrigues MHP. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci*, In Press, Corrected Proof, 2007.
5. Gillan L, Evans G, Maxwell WM. The interaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa with oviductal epithelial cells in vitro. *Reprod Fertil Dev* 2002; 12: 237-44.
6. Isachenko V, Sachenko E, Katkov II, et al. Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability. *Biol Reprod* 2004; 71: 1167-73.
7. Hammadeh ME, Greiner S, Rosenbaum P, Schmidt W. Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure. *J Androl* 2001; 22 (6): 1012-8.
8. Centola OM, Raubertas RF, Mattox JH. Cryopreservation of Human Semen Comparison of Cryopreservatives, Sources of Variability, and Prediction of Post-thaw Survival. *J Androl* 1992; 13: 283-8.
9. McGinnis KL, Zhu L, Lawitts AJ, Bhowmick S, Toner M, Biggers DJ Mouse Sperm Desiccated and Stored in Trehalose Medium Without Freezing. *Biol Reprod* 2005; 73: 627-33.
10. Maxwell WM, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5(6): 613-38.
11. Lopez-Saez A, Ortiz N, Gallego L, Garde JJ. Liquid storage (50c) of ram semen in different diluents *Archives of Andrology* 2000; 44 (2, 1): 155-64.
12. Funahashi H. In vitro fertility of boar spermatozoa preserved at 10 C for 22 days. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16(2): 255-255.
13. Van Thuan N, Wakayama S, Kishigami S, Wakayama T. New preservation method for mouse spermatozoa without freezing. *Biol Rep* 2005; 72: 444-50.
14. Meyers AM. Dry storage of sperm: applications in primates and domestic animals. *Reproduction, Fertility and Development* 2006; 18(2):1-5.
15. Holt VW. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 309-19.
16. Torre LM, Faustini M, Attilio KME, Vigo D. Cell Encapsulation in Mammal Reproduction. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 2007; 1: 81-5.
17. Huang SY, Tu CF, Liu SH, Kuo YH. Motility and fertility of alginate encapsulated boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2005; 87 (1-2): 111-20.
18. Herrler A, Eisner S, Bach V, Weissenborn U, Beier HM. Cryopreservation of spermatozoa in alginate acid capsules. *Fertil Steril* 2006; 85(1): 208-13.
19. Weber W, Rimann M, Schafroth T, Witschi U, Fussenegger M. Design of high-throughput-compatible protocols for microencapsulation, cryopreservation and release of bovine spermatozoa. *J Biotechnol* 2006; 123: 155-63.
20. Torre ML, Maggi L, Vigo D, et al. Controlled release of swine semen encapsulated in calcium alginate beads. *Biomaterials* 2000; 21: 1493-98.