

Títol del treball: Comparació de les principals tècniques de millora de la motilitat espermàtica pel tractament de la infertilitat masculina.

Estudiant: Ona Navarro Camprubí

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: ona.camprubi@gmail.com

Tutor: Dra. Maria Dolores Briz Gonzalez

Cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

2021.05.30 18:16:26 +02'00'

2021.001.20155

Nom del tutor: Dra. Maria Dolores Briz Gonzalez

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): mailo.briz@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

ÍNDEX

| | |
|---|-----|
| Resum | i |
| Resumen | ii |
| Abstract | iii |
| 1. Introducció | 1 |
| 1.1. L'espermatozoide | 1 |
| 1.1.1. Morfologia..... | 1 |
| 1.1.2. Espermatogènesi | 2 |
| 1.1.3. Modificacions post-testiculars | 3 |
| 1.1.4. Procés d'ejaculació | 3 |
| 1.2. La infertilitat masculina | 4 |
| 1.3. La motilitat espermàtica | 5 |
| 1.3.1. L'axonema | 7 |
| 1.3.2. Missatgers involucrats en la motilitat espermàtica | 8 |
| 1.4. L'efecte de l'estrès oxidatiu sobre la motilitat espermàtica | 9 |
| 2. Objectives | 12 |
| 3. Metodologia | 12 |
| Criteris ètics i de sostenibilitat | 13 |
| 4. Resultats i Discussió | 14 |
| 4.1. Millora de la motilitat espermàtica <i>In vivo</i> | 14 |
| 4.2. Millora de la motilitat espermàtica <i>In vitro</i> | 17 |
| 5. Conclusions | 23 |
| 6. Bibliografia | 24 |

Resum

L'espermatozoide humà és un tipus cel·lular altament diferenciat que té la funció de transportar el material genètic fins a dins de l'oòcit, sense que aquest resulti alterat en el procés. Els espermatozoides es formen en els testicles i després han de passar per una sèrie de modificacions per ser funcionals i poder fecundar l'oòcit. Dins d'aquestes modificacions es troba l'adquisició de motilitat, procés essencial perquè, és imprescindible que els espermatozoides presentin una bona motilitat espermàtica per tal d'aconseguir dur a terme la seva funció. El motor que fa possible aquesta motilitat és l'axonema, una estructura microtubular interna que comença a la peça de connexió i arriba fins a la peça terminal de la cua de l'espermatozoide. Així doncs, dels paràmetres implicats en la fertilitat masculina, la motilitat espermàtica té un paper molt important.

L'augment de la taxa d'infertilitat s'ha convertit en un problema clínic en els últims anys i, cada cop més parelles han de recórrer a tècniques de reproducció assistida (TRA) per tal d'aconseguir l'embaràs. Una de les causes més comunes d'infertilitat masculina es deu a problemes relacionats amb la motilitat dels espermatozoides, principalment provocats per una sobreproducció d'espècies reactives de l'oxigen. Per altra banda, la motilitat espermàtica també és un paràmetre important en les TRA, ja que influeix en l'elecció del tractament. Per tant, és necessària la recerca d'agents terapèutics que augmentin *in vitro* i/o *in vivo* la motilitat espermàtica, però, sense afectar la capacitat fecundant dels espermatozoides, ni el posterior desenvolupament embrionari, és a dir, sense provocar efectes secundaris derivats de l'estimulació dels espermatozoides. Per aquesta raó, s'ha realitzat una cerca bibliogràfica amb l'objectiu de conèixer i comparar diferents plantejaments i agents terapèutics que millorin la motilitat espermàtica per tal de tractar la infertilitat masculina a causa d'una baixa qualitat d'aquest paràmetre espermàtic. Normalment, l'augment de la motilitat espermàtica *in vivo* és degut a una reducció de l'estrès oxidatiu a nivell testicular mitjançant l'ús d'antioxidants, en canvi, en els procediments *in vitro*, és degut a l'ús d'inhibidors de la fosfodiesterasa. Els resultats obtinguts *in vitro* són més prometedors en comparació als obtinguts *in vivo*, però, són necessaris més estudis que assegurin que l'ús clínic d'aquests compostos és efectiu i segur.

Resumen

El espermatozoide humano es un tipo celular altamente diferenciado que tiene la función de transportar el material genético hasta dentro del ovocito sin verse alterado en el proceso. Los espermatozoides se forman en los testículos y después deben pasar por una serie de modificaciones para ser funcionales y poder fecundar el ovocito. Dentro de estas modificaciones, se encuentra la adquisición de motilidad, proceso esencial ya que es imprescindible que los espermatozoides presenten una buena motilidad espermática para poder llevar a cabo su función. El motor que hace posible esta motilidad es el axonema, una estructura microtubular interna que va desde la pieza de conexión hasta la pieza terminal de la cola del espermatozoide. Por lo tanto, de los parámetros implicados en la fertilidad masculina, la motilidad espermática tiene un papel muy importante.

El aumento de la tasa de infertilidad se ha convertido en un problema clínico en los últimos años y, cada vez más parejas tienen que recurrir a técnicas de reproducción asistida (TRA) para poder lograr un embarazo. Una de las causas más comunes de infertilidad masculina se debe a problemas relacionados con la motilidad de los espermatozoides, principalmente provocados por una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, la motilidad espermática también es un parámetro importante en las TRA, debido a que influye en la elección del tratamiento. Por lo tanto, es necesaria la investigación de agentes terapéuticos que aumenten *in vitro* y/o *in vivo* la motilidad espermática, pero sin afectar la capacidad fecundante de los espermatozoides, ni el posterior desarrollo embrionario, es decir, sin provocar efectos secundarios derivados de la estimulación de los espermatozoides. Por esta razón, se ha realizado una revisión bibliográfica con el objetivo de conocer y comparar diferentes planteamientos y agentes terapéuticos que mejoren la motilidad espermática para tratar la infertilidad masculina debida a una baja calidad de este parámetro espermático. Normalmente, el aumento de la motilidad espermática *in vivo* es debido a una reducción del estrés oxidativo a nivel testicular mediante el uso de antioxidantes, en cambio, en los procedimientos *in vitro*, es debido al uso de inhibidores de la fosfodiesterasa. Los resultados obtenidos *in vitro* son más prometedores en comparación a los obtenidos *in vivo*, pero, se requieren más estudios que aseguren que el uso clínico de estos compuestos es seguro y efectivo.

Abstract

The human spermatozoon is a highly differentiated cell type whose function is to transport the genetic material into the oocyte, without being altered in the process. Spermatozoa are produced in the testes and then have to undergo some modifications in order to become functional and be able to fertilize the oocyte. Among these modifications, the acquisition of motility is an essential process since it is indispensable that spermatozoa have good motility in order to perform their function. The motor that enables this motility is the axoneme, an internal microtubular structure that begins at the connecting piece and reaches the terminal piece of the sperm tail. Therefore, among the parameters involved in male fertility, sperm motility has a very important role.

In recent years, the increasing rate of infertility has become a clinical problem and, the number of couples that must attend to assisted reproductive techniques (ART), in order to achieve pregnancy, is growing up. One of the most common causes of male infertility is due to problems related to sperm motility, mainly caused by an overproduction of reactive oxygen species. On the other side, sperm motility is also an important parameter in ART, because it influences the choice of the treatment. Therefore, it is necessary to find therapeutic agents that increase sperm motility *in vitro* and/or *in vivo*, but without affecting the fertilization capacity of the spermatozoa or further embryo development, in other words that is, without side effects derived from the process of sperm stimulation. For this reason, a literature search was carried out with the aim of learning and comparing different approaches and therapeutic agents that improve sperm motility to treat male infertility due to a low quality of this sperm parameter. Usually, the increase in sperm motility *in vivo* is due to a decrease of the oxidative stress at a testicular level through the use of antioxidants, meanwhile, in *in vitro* procedures, it is due to the use of phosphodiesterase inhibitors. The results obtained in *in vitro* treatments are more promising compared to those obtained *in vivo* ones, but further research is required to ensure clinical effectiveness and safety of the discussed compounds.

1. Introducció

1.1. *L'espermatozoide*

1.1.1. Morfologia

L'espermatozoide humà es considera un tipus cel·lular altament diferenciat que per a dur a terme la seva funció, ha d'abandonar l'organisme on s'origina (masculí) per arribar al tracte reproductor d'un altre individu (femení), així doncs, el seu objectiu és transportar el material genètic masculí fins a dins de l'òocit, sense que aquest es vegi alterat en el procés de transport (Peña, 2020; Ribas-Maynou i Yeste, 2020).

En l'espermatozoide humà madur es diferencien 3 parts principals: el cap, la peça de connexió i la cua o flagel (*Figura 1*). Per altra banda, el flagel està estructuralment dividit en tres peces: la intermèdia, la principal i la terminal (Wang *et al.*, 2020).

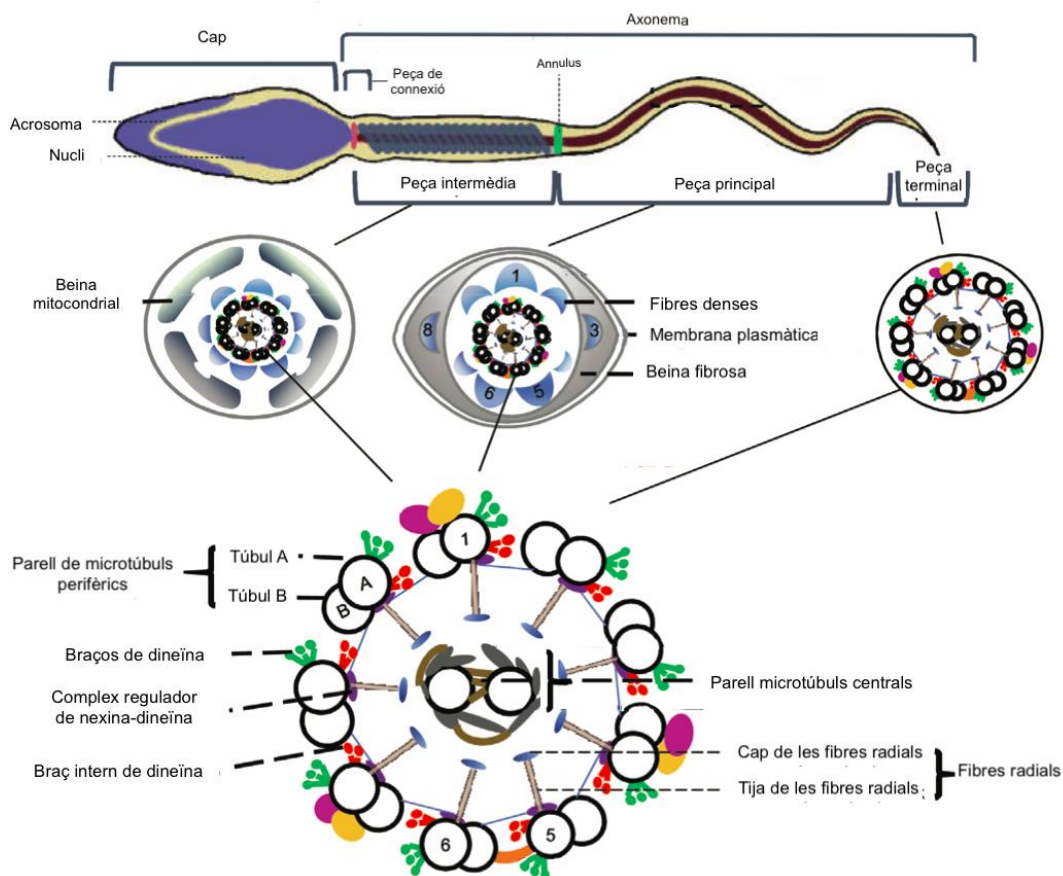


Figura 1. Representació esquemàtica de l'estructura d'un espermatozoide humà madur i de les seccions transversals a nivell de la cua on es mostren les localitzacions aproximades de cada component. Font: modificat de Wang *et al.* (2020).

1.1.2. Espermatogènesi

En el cas dels mamífers, els espermatozoides es formen en els testicles a través d'un complex procés anomenat espermatogènesi (*Figura 2*), en el qual es diferencien 3 fases principals: (i) una fase de proliferació mitjançant el procés de mitosi; (ii) una fase de reducció de la dotació cromosòmica, mitjançant el procés de meiosi; (iii) una fase anomenada espermiogènesi, on es dona la diferenciació des d'una cèl·lula de forma arrodonida (espermatida) fins a una cèl·lula allargada amb tres parts ben diferenciades (espermatozoide). És un procés altament específic que requereix una regulació, principalment, als següents dos nivells: (i) hormonal i endocrí, i, (ii) paracrí o autocrí. Qualsevol anomalia en el procés pot donar lloc al fet que els espermatozoides produïts siguin anormals o, en situacions més greus, a la no producció d'espermatozoides (de Kretser *et al.*, 1998; Flores, 2015; Freitas *et al.*, 2017).

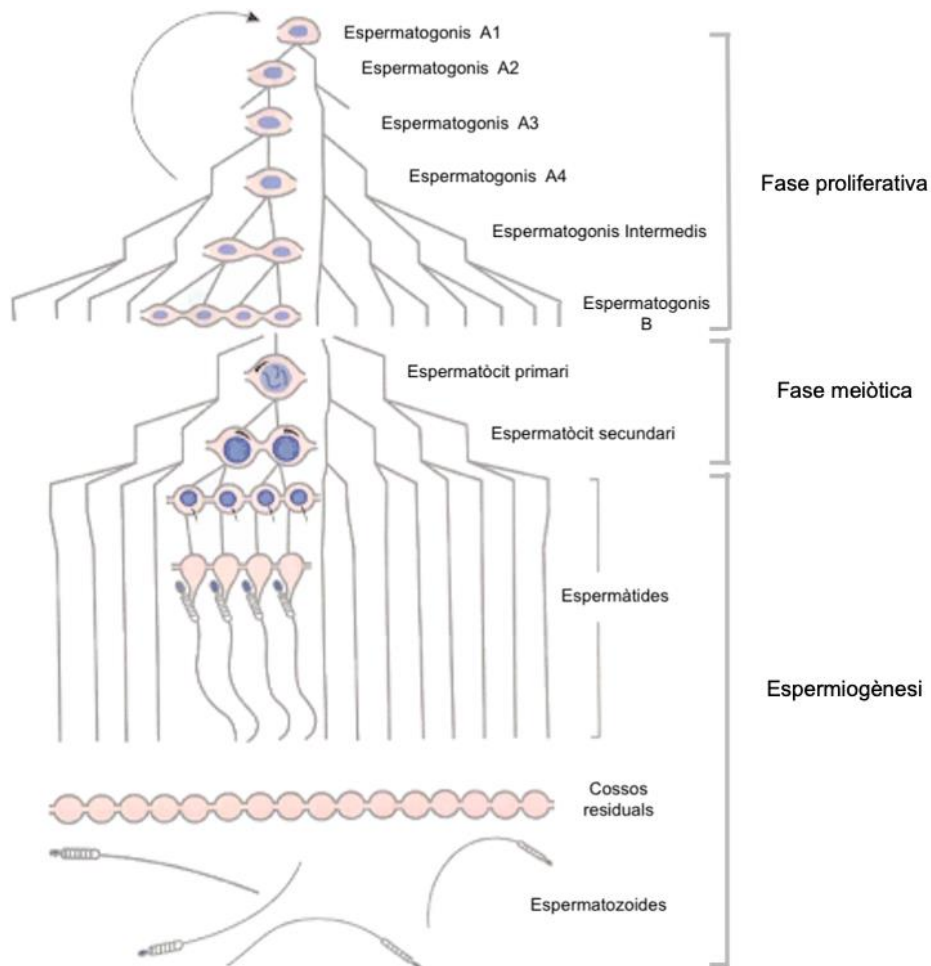


Figura 2. Esquema dels cicles cel·lulars i canvis morfològics que tenen lloc durant la gametogènesi masculina (espermatogènesi) en què es formen espermatozoides a partir de cèl·lules germinals. Font: modificat de Flores (2015).

1.1.3. Modificacions post-testiculars

Una correcta espermatogènesi dona lloc a espermatozoides morfològicament madurs, però, sense capacitat de fecundar l'òocit, sinó que, encara hauran d'experimentar una sèrie de transformacions per ser funcionals: (i) maduració en l'epidídim, que consisteix en la integració d'un conjunt de molècules secretades per l'epiteli epididimari, principalment, en la superfície de l'espermatozoide; (ii) capacitació espermàtica en el tracte reproductor femení, és a dir, la realització d'un conjunt de modificacions bioquímiques i fisiològiques dins del conducte reproductor femení que permeten convertir els espermatozoides en cèl·lules capaces de fecundar un òocit; (iii) reacció acrosòmica, és a dir, l'exocitosi del contingut de l'acrosoma de l'espermatozoide que digereix la zona pel·lúcida (ZP) que envolta l'òocit per tal de penetrar cap al seu interior, fecundar-lo i donar lloc a la formació d'un zigot (Abou-haila i Tulsiani, 2000, 2009; Flores, 2015; Papale *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2017). Totes aquestes transformacions necessàries per dotar de funcionalitat l'espermatozoide són dependents entre elles, ja que, cal una correcta maduració epididimària perquè es pugui donar la capacitació espermàtica, la qual és alhora necessària per poder dur a terme la reacció acrosòmica i, consegüentment, fer possible la fecundació (Freitas *et al.*, 2017).

1.1.4. Procés d'ejaculació

Durant l'ejaculació, els espermatozoides es barregen amb el plasma seminal per tal de ser alliberats dins del tracte reproductor femení. El plasma seminal és un fluid fisiològic format per components secretats pels testicles, l'epidídim i les glàndules sexuals accessòries, és a dir, les vesícules seminals i la pròstata (*Figura 3*), que aporta nutrients als espermatozoides i que sembla tenir un paper modulador en el procés de capacitació espermàtica, en la interacció entre els dos gàmetes i en l'embaràs (Papas *et al.*, 2019).

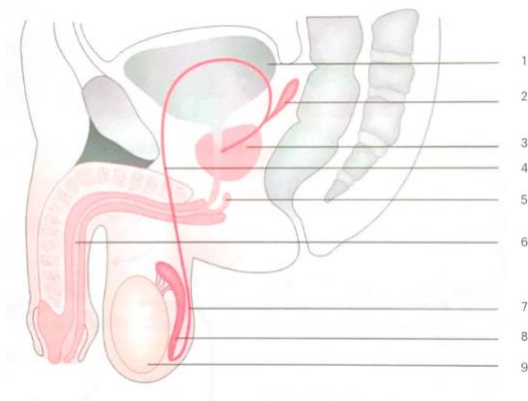


Figura 3. Esquema simplificat de l'anatomia de l'aparell reproductor masculí. (1) Bufeta urinària; (2) Vesícula seminal; (3) Pròstata; (4) Conducte deferent; (5) Glàndula bulbouretral; (6) Uretra; (7) Conducte deferent; (8) Epidídim; (9) Testicle. Font: modificat de Flores (2015).

1.2. La infertilitat masculina

Zegers-Hochschild *et al.* (2009), van definir clínicament la infertilitat de la següent forma: “malaltia del sistema reproductiu definida com a la incapacitat d’aconseguir un embaràs clínic després de dotze mesos o més de relacions sexuals sense protecció”. No obstant això, segons Krausz (2011), aproximadament la meitat de les parelles que durant el primer any han estat mantenint relacions sexuals sense protecció no aconsegueixen un embaràs clínic, sí que ho aconseguiran durant el següent any.

A nivell mundial, la infertilitat masculina s’està convertint en un greu problema, on s’estima que almenys 30 milions d’homes són infèrtils. A més, les taxes mundials d’infertilitat masculina oscil·len entre el 2,5% i el 12%, essent-ne majors a Àfrica i a Europa de l’Est (Agarwal *et al.*, 2015). Per altra banda, en l’àmbit Europeu, s’estima que aproximament 1 de cada 6 parelles es veu afectada per aquesta patologia (World Health Organization [WHO], 2017).

Segons la WHO (2020), la infertilitat masculina pot ser causada per diferents factors: (i) disfuncions en el procés de l’ejaculació per alguna obstrucció del tracte reproductor; (ii) alteracions hormonals; (iii) incapacitat del testicle per dur a terme correctament l’espermatogènesi; (iv) anomalies en la funció i/o en la qualitat dels espermatozoides, com per exemple, formes anormals o una mala motilitat espermàtica, entre d’altres; (v) l’estil de vida i alguns factors ambientals com el contacte durant certs períodes de temps amb contaminants o toxines. Per tant, pot ser causada per a factors congènits o adquirits, o bé, pot ser idiopàtica, és a dir, es desconeix la causa que provoca la infertilitat; aquests factors poden actuar a nivell pre-testicular, post-testicular o testicular (Krausz, 2011).

Per altra banda, la capacitat de procrear pot variar al llarg de la vida d’una parella, ja que aquesta condició es troba molt influenciada per aspectes psicològics, socials, ecològics i ambientals (Flores, 2015).

Actualment, amb algunes excepcions, la teràpia a la qual poden recorre els pacients diagnosticats amb infertilitat masculina és a la utilització de tècniques de reproducció assistida, especialment la fecundació *in vitro* (FIV) o la microinjecció intracitoplasmàtica d’espermatozoides (ICSI). No obstant això, aquestes tècniques de reproducció assistida no tracten la causa de la infertilitat, per tant, hi ha la possibilitat que les anomalies genètiques passin a la descendència (Krausz, 2011).

Si durant el procés de diagnosi d'un pacient amb infertilitat, concretament durant l'anàlisi del semen (seminograma), s'observa algun paràmetre anormal, per denominar la patologia seminal s'utilitza una nomenclatura específica que es mostra resumidament en la *Taula 1* (WHO, 2010; Krausz, 2011).

Taula 1. Nomenclatura utilitzada per descriure els principals paràmetres anòmals amb relació a la qualitat del semen que recull el Manual de la WHO (2010). modificat de: WHO (2010) i Krausz (2011).

| | |
|---------------------------------|--|
| Astenozoospermia | < 32% d'espermatozoides amb motilitat progressiva (PR) |
| Teratozoospermia | < 4% d'espermatozoides morfològicament normals |
| Astenoteratozoospermia | Valor d'espermatozoides amb PR < 32% i valor d'espermatozoides morfològicament normals < 4% |
| Oligozoospermia | Concentració d'espermatozoides < 15 x 10 ⁶ /ml; número total d'espermatozoides < 39 x 10 ⁶ /ml |
| Oligoastenoteratozoospermia | Alteració de la motilitat, la morfologia i la concentració |
| Azoospermia | Absència d'espermatozoides al semen |
| Aspermia | Absència de semen |
| Leucospermia (leucocytospermia) | Presència de valors > 1 x 10 ⁶ /ml de leucòcits al semen |

1.3. La motilitat espermàtica

La motilitat espermàtica és un factor molt important a l'hora de determinar la fertilitat d'un individu, és a dir, per a una bona fertilitat masculina és clau que hi hagi una bona motilitat espermàtica (Turner, 2006). Paoli *et al.* (2011) van definir la motilitat espermàtica com el resultat de la propagació d'ones transversals des de la part proximal a la part distal del flagel, que provoquen un impuls hidrodinàmic que permet que l'espermatozoide pugui arribar a un oòcit i fecundar-lo. En la majoria de mamífers, es diferencien dos tipus de motilitat espermàtica: l'activada i la hiperactivada (Turner, 2006). La motilitat activada s'assoleix durant el pas dels espermatozoides per l'epidídim i es caracteritza perquè el flagel dels espermatozoides activats generen uns moviments simètrics en forma d'ones de baixa amplitud que permeten que viatgin seguint una trajectòria recta a través de medis no viscosos, com el plasma seminal (*Figura 4A*). Un cop els espermatozous activats aconseguixen arribar a la zona de les trompes de Fal·lopi on els dos gàmetes es troben i interactuen (unió istmicoampular), assoleixen un canvi en el patró de moviment del flagel, que passa a ser asimètric i de major amplitud (moviments circulars o seguint un patró semblant a un 8) i que, rep el nom de motilitat hiperactivada (*Figura 4B*); aquest nou tipus de motilitat permet que els espermatozoides puguin travessar el dens moc que troben al tracte reproductor femení, que després es puguin

desenganxar de l'epiteli de l'oviducte per a arribar al lloc on es donarà la fecundació, també està implicada en la dispersió dels enzims que són alliberats de l'acrosoma, a més a més, disgrega les cèl·lules de la corona radiata i augmenta la possibilitat que l'espermatozou interaccioni amb la ZP (Turner, 2006; Flores, 2015; Freitas *et al.*, 2017).

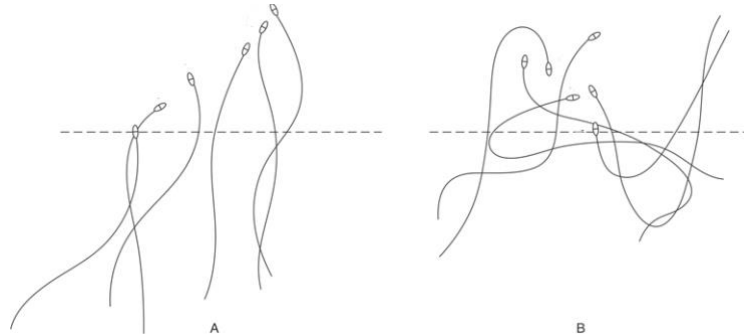


Figura 4. Canvis del patró de mobilitat dels espermatozoides. (A) patró de mobilitat típic en els espermatozoides de l'ejaculat; (B) patró de mobilitat típic dels espermatozoides hiperactivats. Font: modificat de Flores (2015).

Els espermatozoides es poden distingir entre ells en funció de si presenten moviment o no i, també pel tipus de moviment. Per aquesta raó, es classifica la motilitat dels espermatozoides segons diferents categories: (i) motilitat progressiva (PR), quan els espermatozoides es mouen activament, seguint una trajectòria lineal o en un gran cercle, independentment de la velocitat del moviment; (ii) motilitat no progressiva (NP), quan els espermatozoides presenten qualsevol altre patró de motilitat; (iii) immòbils (IM), els espermatozoides que no presenten cap tipus de moviment. Així doncs, en determinar la motilitat dels espermatozoides normalment s'especifica si es parla de motilitat total (PR+NP) o només de la motilitat progressiva (PR) (WHO, 2010).

S'ha observat que el grau de motilitat progressiva dels espermatozoides està relacionat amb la taxa d'embaràs, ja que és necessari un bon moviment perquè es doni la fecundació de l'oòcit (WHO, 2010; Nowicka-Bauer i Nixon, 2020).

Cal tenir en compte que, en el cas d'emprar tècniques de reproducció assistida, el procediment seguit a l'hora d'obtenir l'ejaculació i, les condicions en les quals s'ha mantingut, són factors que també influeixen en la motilitat dels espermatozoides (WHO, 2010).

Per determinar la motilitat dels espermatozoides de forma exacta i fiable s'utilitzen els sistemes d'anàlisi de semen computeritzats (CASA -*Computer Assisted Semen Analysis*), que permeten diferenciar i classificar de manera objectiva les cèl·lules mòbils segons el tipus de moviment detectat. No obstant això, s'han de seguir els procediments adequats

per tal d'obtenir resultats fiables i reproduïbles, ja que hi ha una varietat de factors que poden afectar el funcionament i el rendiment d'aquests sistemes CASA, com per exemple, la preparació de la mostra o la concentració d'espermatozoides (WHO, 2010).

1.3.1. L'axonema

L'estructura interna que proporciona la motilitat a l'espermatozoide, es tracta d'un complex sistema de microtúbuls i proteïnes ben organitzats que constitueix l'anomenat axonema (*Figura 1*), però, el mecanisme detallat mitjançant el qual l'espermatozoide adquireix la motilitat encara no es coneix del tot. Per aquesta raó, el flagel de l'espermatozoide ha d'estar morfològica i ultraestructuralment complet, per tal de produir l'energia necessària per a dotar-lo de motilitat, així com per transduir els senyals externs a senyals interns. Entre l'axonema i la membrana plasmàtica de la cua de l'espermatozoide hi ha diferents estructures citoesquelètiques accessòries, com per exemple les beines mitocondrials, les fibres denses i/o les beines fibroses (*Figura 1*). En la peça intermèdia, l'axonema es troba rodejat per una beina mitocondrial (formada per uns 50-75 mitocondris en forma helicoidal al voltant de l'axonema) i per fibres denses; en la peça principal, sota la membrana plasmàtica es troba una beina fibrosa i fibres denses; en la peça terminal no hi ha cap estructura citoesquelètica accessòria (Bonet *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2017; Barbagallo *et al.*, 2020).

L'axonema és una estructura molt conservada al llarg de l'evolució que es troba present des de la peça de connexió fins a la peça terminal de l'espermatozoide. En eucariotes, l'axonema s'anomena estructura 9+2, a causa de l'anell de nou parells de microtúbuls (túbul A i túbul B) que es troben rodejant dos microtúbuls centrals (*Figura 1*). El túbul A i el túbul B es connecten entre si a través del complex regulador de nexina-dineïna i, cada parell de microtúbuls perifèrics es connecten amb el parell de microtúbuls centrals a través de fibres radials. A més, projecten braços de dineïna, cap a l'interior i cap a l'exterior de cada parell de microtúbuls perifèrics, i són els encarregats de generar la força motriu del flagel (Turner, 2006; Pigino i Ishikawa, 2012; Freitas *et al.*, 2017; Oiwa *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020). El conjunt d'estructures connectades als microtúbuls constitueix una xarxa proteica molt organitzada (Inaba, 2011).

Les dineïnes axonemals, converteixen l'energia química alliberada en la hidròlisi de l'adenosina trifosfat (ATP) en energia mecànica. Per tant, en presència d'ATP, i gràcies a l'activació de les dineïnes a través de la fosforilació i desfosforilació de les proteïnes, i

a la regulació per part de l'aparell central de microtúbuls, els doblats es van movent respecte als doblats del costat i, a conseqüència de la seva unió a la peça de connexió, es produeix una certa resistència que, si només es produeix en un lateral de l'axonema, dona lloc a l'amplitud i a la forma d'onada característiques del moviment de la cua dels espermatozoides (Inaba, 2011; Freitas *et al.*, 2017; King, 2016; Wang *et al.*, 2020).

S'ha observat que l'amplitud i la forma del batec del flagel estan relacionades amb la presència de braços interns de dineïna i, que els braços externs de dineïna estan involucrats en la regulació de la velocitat de propagació (Wang *et al.*, 2020).

Després de molts estudis en diferents espècies, encara no s'ha arribat a una conclusió clara i definitiva sobre si la ruta bioquímica que produeix l'energia necessària perquè l'espermatozoide tingui motilitat, és la glicòlisi o la fosforilació oxidativa. No obstant això, hi ha alguns estudis que semblen indicar que aquestes dues rutes metabòliques poden ser utilitzades per separat o de forma combinada, en funció de quin sigui el substrat (Barbagallo *et al.*, 2020).

1.3.2. Missatgers involucrats en la motilitat espermàtica

L'adquisició de motilitat és un procés molt complex, on hi contribueixen complexes vies de senyalització que es troben regulades per diferents missatgers (*Figura 5*). L'ió calci (Ca^{2+}) és un primer missatger que regula el procés de capacitació, l'adquisició de la motilitat hiperactivada i la reacció acrosòmica; el flux de Ca^{2+} té com a principal funció activar l'adenilat ciclase soluble (sAC) i, s'ha observat que perquè els espermatozoides adquireixin la motilitat hiperactivada, és necessari un augment de la concentració intracel·lular de Ca^{2+} (Dcunha *et al.*, 2020). Per altra banda, el monofosfat d'adenosina cíclic (cAMP) és un segon missatger, els nivells del qual es troben regulats a través de la seva síntesi per l'adenilat ciclase i la seva degradació per les fosfodiesterases (PDE). En el cas dels mamífers, una de les funcions de la sAC és la de regular la motilitat espermàtica, ja que s'encarrega de catalitzar la ciclació intramolecular de l'ATP a cAMP, amb la consegüent alliberació d'un pirofosfat i, s'ha observat que una disminució en els nivells de cAMP s'associa a una disminució de la motilitat. A més, aquest segon missatger activa la ruta de la proteïna-quinasa A (PKA) (Stegborn, 2014; Dcunha *et al.*, 2020).

L'anió bicarbonat (HCO_3^-) també té un paper important en la regulació de la motilitat espermàtica, ja que es troba alcalinitzant el tracte reproductor femení, fet que permet que els espermatozoides puguin transportar-lo dins i adquirir un patró de motilitat

hiperactivada (Pereira *et al.*, 2017; Dcunha *et al.*, 2020). També és un activador directe de la sAC i està implicat en la regulació de la capacitació i de la reacció acrosòmica. A través dels co-transportadors de sodi-bicarbonat que hi ha a la membrana dels espermatozoides, l' HCO_3^- entra dins la cèl·lula, el que provoca un augment del pH intracel·lular i la hiperpolarització de la membrana (Dcunha *et al.*, 2020).

Per tant, perquè l'espermatozoide pugui adquirir un patró de motilitat hiperactivada, les concentracions de Ca^{2+} i de HCO_3^- han d'actuar a través de la via anomenada sAC/cAMP/PKA (Dcunha *et al.*, 2020).

Un augment en el nombre de proteïnes de la família de les tirosines fosforilades és un indicador de la capacitació espermàtica i consegüentment, de la motilitat hiperactivada, ja que la majoria de les vies involucrades en la motilitat dels espermatozoides que es coneixen, pertanyen a una família de proteïnes tirosines que són fosforilades durant el procés d'hiperactivació de l'espermatozoide humà (Dcunha *et al.*, 2020).

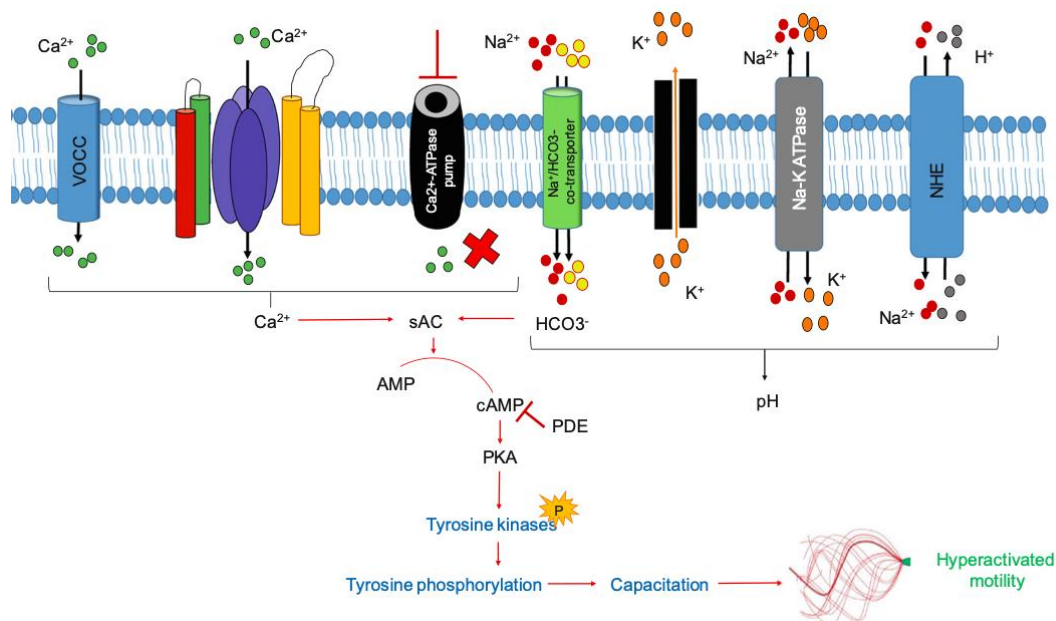


Figura 5. Mecanisme de senyalització involucrat en la motilitat de l'espermatozoide humà: Via sAC/cAMP/PKA. (Ca^{2+} , ió calci; sAC, adenilat ciclasa soluble; HCO_3^- , anió bicarbonat; AMP, monofosfat d'adenosina; cAMP, monofosfat d'adenosina cíclic; PDE, fosfodiesterasa; PKA, proteïna quinasa A). Font: modificat de Dcunha *et al.* (2020).

1.4. L'efecte de l'estrès oxidatiu sobre la motilitat espermàtica

Els mitocondris que es troben en la peça intermèdia de la cua de l'espermatozoide, són els principals generadors d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), a conseqüència de la sortida prematura dels electrons de la cadena respiratòria (Barbagallo *et al.*, 2020; Nowicka-Bauer i Nixon, 2020). Quan es dona un estat d'estrès oxidatiu (OS) perquè hi

ha un augment en la producció de ROS [anió superòxid (O_2^-), peròxid d'hidrogen (H_2O_2), radical hidroxil (HO), òxid nítric (NO) i peroxinitrit ($ONOO^-$)] o, una disminució dels antioxidants de defensa [superòxid dismutasa (SOD), glutatió peroxidasa (GPXs), catalasa (CAT) i peroxiredoxina (PRDXs)], l'activitat mitocondrial, la capacitat fecundant i la motilitat dels espermatozoides disminueixen (O'Flaherty, 2019; Nowicka-Bauer i Nixon, 2020). Això és a causa que els espermatozoides madurs són cèl·lules molt vulnerables als radicals lliures, ja que presenten una quantitat d'antioxidants intracel·lulars de defensa limitada, no tenen la capacitat de traduir les proteïnes i, perquè al llarg de la seva membrana cel·lular s'hi troba una elevada quantitat d'àcids grassos poliinsaturats que, en interaccionar amb ROS, actuen com a substrats oxidables per a les cascades de peroxidació lipídica (O'Flaherty, 2019; Nowicka-Bauer i Nixon, 2020). Durant el procés de peroxidació lipídica (*Figura 6*), es produeix un canvi en la composició i en les propietats biofísiques de la membrana i com a resultat, s'obtenen aldehids lipídics citotòxics, dels quals el més abundant i citotòxic és el 4-Hidroxynomenal (4HNE), ja que els elements estructurals que presenta en la seva estructura li permeten reaccionar amb algunes proteïnes, àcids nucleics i lípids (Nowicka-Bauer i Nixon, 2020).

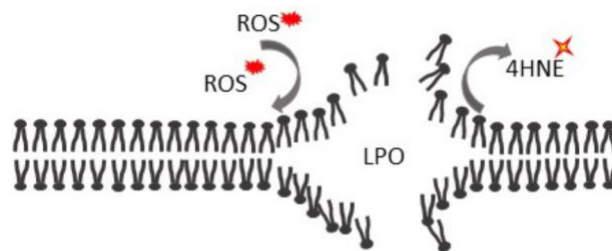


Figura 6. Membrana cel·lular on els àcids grassos poliinsaturats són atacats per ROS, provocant l'inici de les cascades de peroxidació lipídica i la consegüent producció de 4HNE. Font: recuperat de Nowicka-Bauer i Nixon (2020).

L'elevada producció de ROS pels mitocondris i la consegüent peroxidació lipídica a través de la membrana plasmàtica dels espermatozoides, pot desencadenar una peroxidació lipídica secundària a la membrana dels mitocondris. Aquesta peroxidació secundària provoca l'alliberació de protons i electrons de la membrana interna, el que consegüentment genera una pèrdua del potencial de la membrana mitocondrial, un augment en la producció de ROS i una disminució en l'eficiència de generació d'energia en forma d'ATP (Nowicka-Bauer i Nixon, 2020).

La presència de microorganismes i/o leucòcits en el plasma seminal, a causa d'una infecció o d'una inflamació del tracte reproductor masculí, també pot afectar la motilitat

dels espermatozoides i, consegüentment, la seva capacitat fecundant, ja que els leucòcits tenen la capacitat de metabolitzar l'oxigen i, d'aquesta forma induir la producció d'alts nivells de ROS a través d'un procés que s'anomena esclat oxidatiu (WHO, 2010; Nowicka-Bauer i Nixon, 2020).

Durant la migració dels espermatozoides immadurs i madurs, des dels túbuls seminífers fins a l'epidídim, els espermatozoides immadurs indueixen la formació de ROS que, en entrar en contacte amb els espermatozoides madurs, poden provocar la fragmentació del DNA a causa de l'activació de les caspases i les endonucleases dels espermatozoides, o bé, per l'alteració de la membrana a causa de la peroxidació lipídica (Ollero *et al.*, 2001; Sakkas i Alvarez, 2010).

Pel correcte funcionament dels espermatozoides, són necessaris uns nivells fisiològics de ROS, però, quan es dona una sobreproducció, el sistema de defensa contra l'atac de ROS que té l'aparell reproductor masculí, el qual està basat en un ampli ventall d'antioxidants amb capacitat d'eliminar els radicals lliures, no és prou eficient i és quan es dona l'OS (Nowicka-Bauer i Nixon, 2020). Per tant, aquest sistema de defensa és limitat i per aquesta raó, es requereix una protecció antioxidant exògena per part d'enzims donats durant el procés d'espermatogènesi i de maduració en l'epidídim (O'Flaherty, 2019; Nowicka-Bauer i Nixon, 2020).

2. Objectives

The aim of this review is to know and compare different approaches and therapeutic agents that can improve the sperm motility in order to treat male infertility due to this sperm parameter.

3. Metodologia

Aquest treball s'ha elaborat durant els mesos de Desembre de 2020 al Maig de 2021 a partir de la cerca bibliogràfica en diferents bases de dades, concretament, PubMed, ScienceDirect, SpringerLink, ResearchGate i Elsevier i, també mitjançant la consulta de llibres en paper recuperats del catàleg de la biblioteca de la Universitat de Girona i de l'eina visual Connected Papers.

Primerament es va fer una cerca d'articles de revisió sistemàtica. Aquesta primera cerca es va realitzar per obtenir una idea general de la infertilitat masculina i, especialment, sobre aquesta patologia deguda a anomalies de la motilitat dels espermatozoides. Un cop analitzada la informació obtinguda mitjançant els articles de revisió, es va continuar fent una segona cerca molt més especialitzada per tal de poder estudiar i comparar les diferents tècniques utilitzades per a la millora de la motilitat espermàtica trobades a la literatura.

Per tal de realitzar aquesta cerca bibliogràfica d'estudis sobre el tema d'interès pel present treball, es van utilitzar les següents paraules clau:

- *Sperm motility*
- *Human sperm motility*
- *Improvement of sperm motility*
- *Male infertility*
- *Sperm flagella*
- *Sperm hyperactivation*
- *Human sperm motility stimulants*

A més, com a criteris d'inclusió, es van seleccionar els articles publicats entre l'any 1983 i l'any 2021.

criteris ètics i de sostenibilitat

En la majoria d'estudis consultats durant la realització d'aquest treball, s'ha requerit la utilització de mostres biològiques extretes d'animals o d'humans, el que obre un debat bioètic i legal. En el cas que l'estudi requereixi l'ús d'animals, s'han d'aplicar sempre que sigui possible els requisits de les tres R: reemplaçar l'ús d'animals per alguna alternativa, reduir el nombre d'animals utilitzats i refinar les activitats que requereixen animals per tal d'evitar-los-hi qualsevol dolor o malestar que puguin sentir. A més, en tot moment s'hauran de seguir les normes establertes pel Real Decret 53/2013 i per la llei 32/2007, que regulen el benestar dels animals amb finalitats d'experimentació. En el cas d'assajos clínics que requereixin la participació d'humans, sempre es requereix un consentiment informat per part del pacient. A més, s'hauran de respectar les consideracions ètiques establertes en la Declaració de Helsinki referent a la recerca mèdica amb sers humans, els catorze principis que recull el Conveni d'Oviedo, les normes bàsiques de Bona Pràctica Clínica i, els protocols d'estudi sempre hauran de ser revisats i aprovats pel Comitè d'Ètica en investigació clínica dels hospitals on es realitza l'assaig.

Per altra banda, aquest treball s'ha realitzat seguint els criteris d'ètica científica, de manera que, s'ha evitat el frau o el plagi a altres autors mitjançant un correcte ús de les cites bibliogràfiques.

Pel que fa als criteris de sostenibilitat seguits durant la realització del treball, els articles i altres documents emprats per a l'estudi no han estat impresos, sinó que han estat consultats mitjançant dispositius electrònics, amb l'objectiu de causar el mínim impacte ambiental.

4. Resultats i Discussió

La cerca bibliogràfica duta a terme en aquest treball ha permès la selecció de 39 articles científics per a l'anàlisi i discussió referent a la motilitat espermàtica i, sobretot, a les possibles tècniques de millora pel tractament d'alguns tipus d'infertilitat masculina.

Hi ha molts paràmetres implicats en la fertilitat d'un pacient, però, n'hi ha que tenen un paper més important a l'hora de predir el resultat d'embaràs, essent-ne un exemple la motilitat dels espermatozoides. A més, la motilitat també és un paràmetre important a l'hora de decidir quin és el tractament més efectiu a dur a terme per tractar una parella amb problemes d'infertilitat. La millora de la motilitat dels espermatozoides, per tal d'augmentar els resultats dels tractaments de reproducció assistida, és un procés que es pot realitzar tant *in vivo* com *in vitro* (Dcunha *et al.*, 2020).

4.1. Millora de la motilitat espermàtica *In vivo*

Per una banda, per tal de millorar la motilitat dels espermatozoides *in vivo*, normalment es pauta l'administració oral d'antioxidants, com la vitamina C, la L-carnitina o el Coenzim Q10; elements traça, com el zinc; agents farmacològics, com la pentoxifilina o l'avanfil; i/o compostos naturals, com extractes de l'arrel de *Withania somnifera*, administrats per separat o combinats entre ells, amb l'objectiu de millorar la producció a nivell testicular o la qualitat del semen (Lenzi *et al.*, 2003; Akmal *et al.*, 2006; Omu *et al.*, 2008; Balercia *et al.*, 2009; Safarinejad, 2011; Azgomi *et al.*, 2018; Tsounapi *et al.*, 2018; Dcunha *et al.*, 2020).

Generalment, aquest tipus de tractament està enfocat a reduir l'estrès oxidatiu (OS) a nivell testicular mitjançant l'administració d'antioxidants (Dcunha *et al.*, 2020). Alguns estudis han descrit aplicacions terapèutiques molt prometedores, basades en l'administració de barreges d'antioxidants enzimàtics i no enzimàtics (Piomboni *et al.*, 2008). Hi ha compostos, com la vitamina C, el zinc i la L-carnitina, que tenen capacitat antioxidant, el que els converteix en grans candidats per a millorar les patologies provocades per l'OS (Balercia *et al.*, 2005; Akmal *et al.*, 2006; Omu *et al.*, 2008; Nowicka-Bauer i Nixon, 2020).

En un estudi de Piomboni *et al.* (2008), es van seleccionar 51 pacients diagnosticats amb leucocitospèrmia associada amb astenoteratozoospèrmia, 36 d'aquests pacients van ser

tractats amb dos comprimits al dia durant noranta dies, contenint cada comprimit 20 mg de β -glucans, 50 mg de papaia fermentada, 97 mg de lactoferrina, 30 mg de vitamina C i 5 mg de vitamina E (Progine, Florence, Italy). Al final del tractament, s'observà un increment en el percentatge d'espermatozoides amb morfologia normal i amb motilitat progressiva total i, a més, una disminució de la concentració de leucòcits presents en el fluid seminal (*Taula 2*). Es creu que aquests prometedors resultats es van obtenir a causa de la presència de moduladors de la resposta immunitària i inflamatòria, com els β -glucans, la papaia fermentada i la lactoferrina, barrejats amb antioxidants naturals com la vitamina C i E, que fan que augmentin les defenses dels espermatozoides contra l'oxidació. Piomboni *et al.*, (2008), remarquen que no es coneix el mecanisme pel qual els paràmetres espermàtics dels pacients que van participar en l'estudi es troben alterats. Una possible causa podria ser que durant la migració dels espermatozoides des dels túbuls seminífers fins a l'epidídim, la presència de leucòcits en el plasma seminal induís la formació de ROS. No obstant això, un altre mecanisme que també podria ser el causant de la disminució de la motilitat espermàtica, seria l'alteració de la membrana plasmàtica amb una consegüent pèrdua d'ATP i de lesions en l'axonema (Piomboni *et al.*, 2008).

Taula 2. Paràmetres espermàtics analitzats en els pacients tractats i no tractats, abans i després del tractament amb β -glucans, papaia fermentada, lactoferrina, vitamina C i vitamina E. ^b*P* < 0,05; ^c*P* < 0,01 (prova U de Mann-Whitney), comparats amb els valors d'abans del tractament. Font: recuperat de Piomboni *et al.* (2008).

| Sperm parameters | Treated (n = 36) | | Untreated (n = 15) | | WHO parameters |
|---|------------------|-----------------------------|--------------------|----------------|-------------------|
| | Before | After | Before | After | |
| Sperm count (1×10^6 /mL) | 48.5 \pm 8.9 | 46.2 \pm 9.3 | 51.1 \pm 6.0 | 49.0 \pm 5.4 | > 20 |
| Progressive motility (%) | 19.0 \pm 7.8 | 34.8 \pm 6.8 ^c | 21.3 \pm 5.1 | 23.8 \pm 4.2 | > 50% |
| Leukocytes (1×10^6 /mL) | 2.2 \pm 0.9 | 0.9 \pm 0.2 ^c | 1.4 \pm 0.9 | 1.8 \pm 1.4 | < 1×10^6 |
| Normal morphology (%) | 17.0 \pm 5.2 | 29.8 \pm 6.5 ^c | 21.5 \pm 6.2 | 19.1 \pm 4.1 | > 30% |
| Eosin test (% necrotic) | 49.3 \pm 12.1 | 38.7 \pm 6.7 ^b | 55.1 \pm 9.8 | 57.2 \pm 6.5 | < 40% |
| Acridine orange staining (abnormal sperm %) | 16.7 \pm 8.0 | 14.4 \pm 6.0 | 15.8 \pm 6.7 | 16.1 \pm 5.4 | — |

En un estudi d'Omu *et al.* (2008), on a pacients amb astenozoospermia, amb una concentració espermàtica d'entre 20-250 milions/mL i amb la presència de >40% d'espermatozoides immòbils, se'ls hi van administrar oralment suplementes de zinc i suplementes de zinc combinat amb vitamina E i vitamina C, i es va observar un augment de la motilitat espermàtica, a conseqüència d'una reducció d'OS, de la quantitat d'espermatozoides apoptòtics i de la fragmentació del DNA (Omu *et al.*, 2008; Nowicka-Bauer i Nixon, 2020). A més, també s'observa una elevada integritat de la membrana cel·lular, un augment de la capacitat antioxidant del fluid seminal i una reducció dels anticossos antiespermatozoides. Els autors proposen que la millora de la qualitat

espermàtica observada, és degut a un possible augment de l'expressió de l'enzim Zn-Cu SOD, el que provoca un augment de la capacitat antioxidant del fluid seminal, i per altra banda, la reducció de l'apoptosi espermàtica és degut a l'increment dels nivells d'expressió de l'antiapoptòtic *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) i a la reducció d'expressió de la proteïna X associada a Bcl-2 (Bax). Bcl-2 està implicat en la regulació de l'apoptosi perquè actua com a antioxidant en la membrana externa dels mitocondris, el que evita que el citocrom C sigui alliberat (Omu *et al.*, 2008).

Segons un estudi de Balercia *et al.* (2005), en administrar durant un llarg període de temps L-carnitina i el seu acil derivat, L-acilcarnitina, per separat i de forma combinada, a pacients amb astenozoospermia idiopàtica, la motilitat total dels espermatozoides augmenta i aquest increment, és major com menors siguin els valors cinètics de partida. A més, en els tractaments de L-carnitina conjuntament amb L-acilcarnitina, s'observa una millora estadísticament significativa en la velocitat progressiva en línia recta dels espermatozoides. No obstant això, encara no es coneix el mecanisme a través del qual la L-carnitina actua com a antioxidant. Per altra banda, un estudi de Sigman *et al.* (2006), va obtenir uns resultats oposats als obtinguts per Balercia *et al.* (2005) i Lenzi *et al.* (2003), ja que en tractar pacients amb astenozoospermia idiopàtica amb L-carnitina i L-acilcarnitina, no van observar un augment estadísticament significatiu de la motilitat dels espermatozoides.

Per incrementar la motilitat *in vivo*, també es poden utilitzar diferents agents farmacològics. Alguns exemples són l'ús d'inhibidors de fosfodiesterases, com la pentoxifilina o l'avanfil (Dcunha *et al.*, 2020; Safarinejad, 2011; Tsounapi *et al.*, 2018). Pel que fa a la pentoxifilina, un estudi de Safarinejad (2011) va concloure que el tractament amb pentoxifilina via oral incrementava els paràmetres seminals, com la motilitat espermàtica, en pacients amb oligoastenoteratozoospermia idiopàtica. L'estudi es va realitzar amb 254 homes diagnosticats amb oligoastenoteratozoospermia idiopàtica, dels quals 127 van ser tractats dos cops al dia amb 400 mg de pentoxifilina (Apo-Pentoxifylline, Apotex Inc., Toronto, Canada) i un altre grup de 127 pacients amb placebo, durant 24 setmanes (Safarinejad, 2011).

Per altra banda, alguns estudis han barrejat aquests agents farmacològics amb compostos bioactius com els elements traça o els antioxidants, i en administrar-los oralment, s'ha obtingut un increment de la motilitat (Dcunha *et al.*, 2020). N'és un exemple l'estudi de

Tsounapi *et al.* (2018), on es va observar un augment de la motilitat dels espermatozoides i un increment en el percentatge d'espermatozoides hiperactivats sota condicions que indueixen a la capacitació en pacients amb oligoastenospèrmia, en suplementar oralment els pacients amb: (i) una barreja de 8 micronutrients [L-carnitina, L-arginina, coenzim Q10, vitamina E, zinc, àcid fòlic, glutatió i seleni (Profertil, LENUS PHARMA)], (ii) Profertil amb l'agent farmacològic avantfil i (iii) avantfil.

A més, alguns estudis també han aportat evidències que l'ús de compostos naturals i/o extractes de plantes en cru, poden augmentar la motilitat dels espermatozoides (Dcunha *et al.*, 2020). N'és un exemple, l'estudi d'Azgomi *et al.* (2018), on van observar que en administrar oralment durant noranta dies, extractes de l'arrel de *Withania somnifera* a pacients amb infertilitat idiopàtica, es donava un augment de la motilitat dels espermatozoides, del recompte mitjà d'espermatozoides i del nombre d'espermatozoides amb morfologia normal. No obstant això, no hi ha gaires estudis en humans sobre l'efecte d'extractes de plantes en l'augment de la motilitat dels espermatozoides (Dcunha *et al.*, 2020).

4.2. Millora de la motilitat espermàtica *In vitro*

Per altra banda, per tal de millorar la motilitat dels espermatozoides *in vitro*, s'utilitzen diferents agents farmacològics i fisiològics amb diferents models d'acció. Normalment, s'utilitzen inhibidors de la fosfodiesterasa (PDE), diferenciant-ne dos tipus: (i) inhibidors selectius, com per exemple el 8-metoxi-isobutil-metilxantina (8-MeIBMX), RS-25344 o Sildenafil i, (ii) inhibidors no selectius, com la cafeïna o la pentoxifilina. També s'utilitzen: estimuladors de l'enzim adenil ciclase com la 2'-deoxiadenosina; moduladors de canals de calci com el diltiazem, la flunarizina o el verapamil; vitamines i antioxidants com la biotina; herbes medicinals com l'extracte de *Tribulus terrestris*; co-cultiu dels espermatozoides amb cèl·lules de les trompes de Fal·lopi o cèl·lules Vero; i hormones i factors de creixement com els factors activadors de plaquetes, la tiroxina o la substància inhibidora mülleriana (Moussa, 1983; Hong *et al.*, 1985; Aitken *et al.*, 1986; Ricker *et al.*, 1989; Kervancioglu *et al.*, 1994; Fisch *et al.*, 1998; Siow *et al.*, 1998; Lefièvre *et al.*, 2000; Kalthur *et al.*, 2012; Mendeluk i Rosales, 2016; Khaleghi *et al.*, 2017; Nabi *et al.*, 2017; Dcunha *et al.*, 2020).

Les metilxantines, com la cafeïna i la pentoxifilina, són derivats de la xantina (*Figura 7*) que actuen com a inhibidors no selectius de la PDE, el que provoca un augment dels

nivells cel·lulars de cAMP en els espermatozoides, i, hi ha evidències sobre el fet que el cAMP activa unes quinases dependents de cAMP que indueixen la fosforilació d'algunes proteïnes de la cua involucrades en l'activació de diferents paràmetres relacionats amb la motilitat, el que consegüentment provoca que el nombre d'espermatozoides que presenten un patró de motilitat hiperactivada augmenti (Lindemann i Kanous, 1989; Bajpai i Doncel, 2003; Henkel i Schill, 2003).

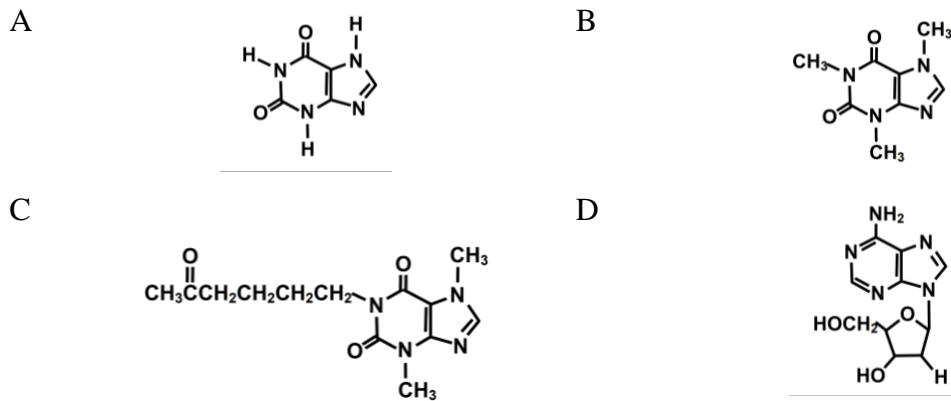


Figura 7. Estructures moleculars de (A) Xantina, (B) Cafeïna, (C) Pentoxifilina, (D) 2-deoxiadenosina. Font: recuperat de Henkel, i Schill (2003).

Diferents estudis han demostrat la capacitat de la cafeïna (*Figura 7B*) per incrementar la motilitat espermàtica, però, malgrat això, segons un estudi d'Imoedemhe *et al.* (1992) realitzat amb espermatozoides humans normals, l'exposició a cafeïna fa augmentar la motilitat, però, la capacitat fecundant d'aquests espermatozoides i el posterior desenvolupament embrionari es veuen afectats. També s'ha de tenir en compte la concentració de cafeïna a la qual s'exposen els espermatozoides, ja que, segons algun estudi existent, elevades concentracions de cafeïna provoquen la immobilització dels espermatozoides (Moussa, 1983), per tant, justament l'efecte contrari al desitjat. Per aquestes raons, l'ús de la cafeïna com a estimulador de la motilitat espermàtica en tècniques de reproducció assistida està restringit només per al seu ús en recerca (Henkel, i Schill, 2003).

La pentoxifilina (*Figura 7C*) està aprovada pel seu ús clínic i hi ha estudis que demostren el seu potencial estimulador de la motilitat en espermatozoides de mostres fresques i postdescongelades (Henkel, i Schill, 2003). Segons un estudi de Nabi *et al.* (2017), dut a terme amb mostres postdescongelades extretes de trenta pacients amb astenozoospermia i incubades durant 30 minuts en una solució de pentoxifilina, es va poder observar que

aquest tractament provocava un augment de la taxa de motilitat progressiva, sense malmetre la integritat de la cromatina/DNA. Kay *et al.* (1993), van demostrar que la pentoxifilina, sota les condicions de capacitació, estimulava la hiperactivació dels espermatozoides, sobretot en mostres postdescongelades de pacients amb oligozoospermia o normozoospermia. A més, aquest efecte es prolongava durant una hora després d'eliminar la pentoxifilina de la mostra. Tal com s'ha comentat anteriorment, la pentoxifilina també es pot utilitzar en tractaments *in vivo* (Safarinejad, 2011).

Hi ha diferents formes de PDE, les quals es classifiquen en 11 famílies que presenten diferents propietats cinètiques i de regulació (Tardif *et al.*, 2014). Fisch *et al.* (1998) van identificar que de les famílies de PDE que es coneixen, PDE 1 i PDE 4 s'expressen en els espermatozoides humans i en representen un 60-70% de l'activitat de PDE. PDE 1 és calci-calmodulina dependent, que es troba majoritàriament a la zona del cap espermàtic i està relacionada amb la iniciació de la reacció acrosòmica. Per altra banda, PDE 4 és específica de cAMP, està regulada a través de la fosforilació, es troba majoritàriament a la peça intermèdia de la cua de l'espermatozoide i està relacionada amb el paràmetre de la motilitat (Fisch *et al.*, 1998).

Per tant, la cafeïna i la pentoxifilina són considerats inhibidors de la PDE de primera generació, ja que, les concentracions necessàries per a estimular la motilitat dels espermatozoides, poden induir una reacció acrosòmica prematura, a causa de la inhibició inespecífica de la PDE, el que provocarà una reducció de la capacitat fecundant de l'espermatozoide (Fisch *et al.*, 1998). Conseqüentment, si es vol realitzar una inseminació amb mostres fresques o postdescongelades tractades amb inhibidors de primera generació, s'ha de tenir en compte que el percentatge d'espermatozoides que presenten una reacció acrosòmica prematura augmenta i, com que els espermatozoides amb l'acrosoma prèviament reaccionat no poden fecundar l'oòcit, aquest augment pot comprometre l'èxit de la inseminació (Fisch *et al.*, 1998).

Per aquesta raó, va sorgir la necessitat de trobar inhibidors específics de la PDE, per tal de poder estimular la motilitat sense que es produís una reacció acrosòmica prematura. Mitjançant l'ús d'alguns inhibidors selectius de PDE, s'ha determinat que les famílies PDE 1 (8-MeIBMX) i PDE 4 (RS-25344) (Fisch *et al.*, 1998), PDE 3 (*trequinsin hydrochloride*) (McBrinn *et al.*, 2019), PDE 5 (Sildenafil) (Lefièvre *et al.*, 2000) i PDE

10 (papaverina) (Terriou *et al.*, 2015), es troben presents en els espermatozoides humans i n'incrementen la motilitat (Tardif *et al.*, 2014; Dcunha *et al.*, 2020).

Un altre tractament es basa en l'ús d'anàlegs del cAMP (Dcunha *et al.*, 2020). Un estudi d'Aitken *et al.* (1986) va proposar la utilització de la 2-deoxiadenosina (*Figura 7D*), un anàleg de l'adenosina que presenta un anell de ribosa modificat, per tal d'augmentar la motilitat dels espermatozoides, obtenint com a resultat que s'induïa la producció de cAMP. No obstant això, hi ha poca informació sobre l'aplicació dels anàlegs de cAMP en tècniques de reproducció assistida (Dcunha *et al.*, 2020).

Per altra banda, un estudi d'Angelopoulos *et al.* (1999), van determinar que una alternativa per a obtenir espermatozoides mòbils per emprar en tècniques de microinjecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI), era obtenir-los a través de cultius de biòpsia testicular, ja que, els resultats que s'obtenien després de 48 hores de cultiu eren comparables a si s'incubaven durant 30 minuts amb pentoxifilina i 2-deoxiadenosina, però, sense els efectes secundaris negatius que poden provocar a l'òocit o a l'embrió.

També es poden utilitzar alguns agents fisiològics, com les hormones o els factors de creixement (Dcunha *et al.*, 2020). En l'estudi de Siow *et al.* (1998), per exemple, es van obtenir resultats que suggerien que, en incubar espermatozoides provinents de mostres fresques i de mostres postdescongelades en una solució amb la substància inhibidora mülleriana, es donava un augment en la motilitat i en la seva viabilitat i longevitat dels espermatozoides. Un altre estudi suggerí l'acció no genòmica de la tiroxina com a estimulador de la motilitat per millorar la recuperació dels espermatozoides després d'aplicar mètodes d'enriquiment com el *swim-up* (Mendeluk i Rosales, 2016). S'entén com a acció no genòmica de les hormones tiroides, aquelles independents dels receptors nuclears, que no estan iniciades pel lligand de l'hormona i que són independents de la síntesi de proteïnes, el que implica que la resposta d'aquestes accions no es manté durant un llarg període de temps (Mendeluk i Rosales, 2016).

N'és un altre exemple el factor activador de les plaquetes (PAF), un potent fosfolípid de senyalització biològica implicat en una varietat de processos reproductius i que presenta potents accions en un ventall de cèl·lules i teixits (Sengoku *et al.*, 1993; Henkel i Schill, 2003; Grassi *et al.*, 2010).

S'ha trobat que els espermatozoides presenten receptors específics pel PAF, sobretot en la regió del coll i la peça intermèdia (Reinhardt *et al.*, 1999), a més, s'ha observat que la distribució d'aquests receptors es veu alterada en els espermatozoides humans anormals, en comparació a la distribució en els espermatozoides normals (Roudebush *et al.*, 2000). En la peça intermèdia es troben els mitocondris, els quals estan involucrats en la motilitat de l'espermatozoide i en la regió del coll, es troba el centríol proximal, el qual està implicat en el procés de preimplantació i del desenvolupament de l'embrió (Sathananthan *et al.*, 1996; Reinhardt *et al.*, 1999). Per tant, el PAF pot estimular els centríols dels espermatozoides i consegüentment, augmentar la probabilitat d'èxit de la fecundació i millorar les taxes de desenvolupament dels embrions (Roudebush i Purnell, 2000). El mecanisme d'acció de PAF sobre els espermatozoides encara no es coneixen amb detall, però, se sap que en altres cèl·lules actua a través de receptors específics (Grassi *et al.*, 2010).

Un estudi de Roudebush i Purnell (2000), va observar que en espermatozoides humans processats per a realitzar un procés de fecundació *in vitro* (FIV), el contingut endogen de PAF està positivament relacionat amb l'índex de motilitat i de concentració, la taxa d'implantació i el resultat de l'embaràs. Per altra banda, un estudi de Ricker *et al.* (1989) van observar que en incubar espermatozoides humans en una solució amb PAF sintètic, és a dir, exogen, a unes concentracions d'entre $3,69 \times 10^{-7}$ a $3,69 \times 10^{-13}$ M, la seva motilitat es veia incrementada i, aquest increment era major com menor era la motilitat de partida dels espermatozoides. A més, l'eficàcia de la millora depèn de la concentració d'ePAF, del temps d'incubació i del grau de motilitat dels espermatozoides de la mostra de partida (Grassi *et al.*, 2010).

També es pot incrementar la motilitat espermàtica *in vitro* a través del co-cultiu dels espermatozoides amb, per exemple, cèl·lules epitelials de les trompes de Fal·lopi o cèl·lules Vero (Kervancioglu *et al.*, 1994; Dcunha *et al.*, 2020). Al co-cultivar els espermatozoides en cultius en monocapa amb cèl·lules Vero o en cultius en monocapa amb cèl·lules epitelials de les trompes de Fal·lopi s'observava un augment de la motilitat espermàtica, però, només s'induïa la capacitat espermàtica en presència de cèl·lules epitelials de les trompes de Fal·lopi (Kervancioglu *et al.*, 1994). Un estudi de Kervancioglu *et al.* (2000), va determinar que el contacte físic entre el cultiu en monocapa de cèl·lules epitelials de les trompes de Fal·lopi i els espermatozoides de pacients

normozoospermics és el que promou la inducció de la hiperactivació i estimula la motilitat espermàtica, entre altres característiques del moviment dels espermatozoides.

La utilització d'herbes medicinals amb un alt contingut d'antioxidants també sembla actuar com a estimulants de la motilitat dels espermatozoides, però, al tractar-se de productes naturals, pot haver-hi molta varietat entre cada lot i per aquesta raó, és necessari la identificació del/s principis actius de l'extracte cru responsable/s de l'augment de la motilitat (Khaleghi *et al.*, 2017; Dcunha *et al.*, 2020).

5. Conclusions

- One of the most common causes of male infertility is due to problems with sperm motility, therefore this sperm quality parameter is a good indicator of male fertilizing capacity. For this reason, over the years, different therapeutic agents have been studied to analyse their capacity to increase sperm motility through *in vivo* and *in vitro* approaches, with the aim to treat male infertility due to this sperm parameter.
- The improvement in sperm motility *in vivo* is usually due to the reduction of oxidative stress through the oral administration of antioxidants. However, several studies have also reported the stimulant effect in sperm motility of some trace elements, pharmacological agents and herbal extracts, administered alone or in combination.
- The increase in sperm motility *in vitro* is usually due to a rise of the cellular levels of cAMP by means of phosphodiesterase inhibitors. Even so, several studies have also reported the stimulant effect in sperm motility of adenylyl cyclase enzymes stimulators, herbal medicines, hormones and growth factors, vitamins and antioxidants, calcium channel modulators and through co-culture of sperm with different cell types.
- Promising results have been obtained using above all *in vitro* approaches. Furthermore, as many of the studies consulted emphasize, the improvement of sperm motility was greater the lower baseline values were.
- It should be noted that treatments to improve spermatozoa motility and, consequently, their clinical viability and efficiency, must not damage sperm genetic material, nor alter the membrane integrity, nor decrease the fertility rate, and the stimulating effect needs to be maintained for a period of time after elimination of the enhancer.
- Further research is required to ensure clinical effectiveness and safety of the therapeutic agents used to improve sperm motility.
- Finally, *in silico* procedures may be helpful to identify new compounds or to improve the available ones to turn them more effective and free from unwanted side effects.

6. Bibliografia

- Abou-haila, A., i Tulsiani, D. R. P. (2000). Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of biochemistry and biophysics*, 379(2), 173-182. doi: 10.1006/abbi.2000.1880
- Abou-haila, A., i Tulsiani, D. R. P. (2009). Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of biochemistry and biophysics*, 485(1), 72-81. doi: 10.1016/j.abi.2009.02.003
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., i Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology*, 13, 37. doi: 10.1186/s12958-015-0032-1
- Aitken, R. J., Mattei, A., i Irvine, S. (1986). Paradoxical stimulation of human sperm motility by 2-deoxyadenosine. *Journal of reproduction and fertility*, 78(2), 515-527. doi: 10.1530/jrf.0.0780515
- Akmal, M., Qadri, J. Q., Al-Waili, N. S., Thangal, S., Haq, A., i Saloom, K. Y. (2006). Improvement in human semen quality after oral supplementation of vitamin C. *Journal of medicinal food*, 9(3), 440-442. doi: 10.1089/jmf.2006.9.440
- Angelopoulos, T., Adler, A., Krey, L., Licciardi, F., Noyes, N., i McCullough, A. (1999). Enhancement or initiation of testicular sperm motility by in vitro culture of testicular tissue. *Fertility and sterility*, 71(2), 240-243. doi: 10.1016/s0015-0282(98)00434-8
- Azgoni, R. N. D, Nazemiyeh, H., Sadeghi Bazargani, H., Fazljou, S. M. B., Nejatbakhsh, F., Moini Jazani, A., Ahmadi AsrBadr, Y., i Zomorodi, A. (2018). Comparative evaluation of the effects of Withania somnifera with pentoxifylline on the sperm parameters in idiopathic male infertility: A triple-blind randomised clinical trial. *Andrologia*, 50(7), e13041. doi: 10.1111/and.13041
- Bajpai, M., i Doncel, G. F. (2003). Involvement of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. *Reproduction*, 126(2), 183-195. doi: 10.1530/rep.0.1260183
- Balercia, G., Buldreghini, E., Vignini, A., Tiano, L., Paggi, F., Amoroso, S., Ricciardo-Lamonica, G., Boscaro, M., Lenzi, A., i Littarru, G. (2009). Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Fertility and sterility*, 91(5), 1785-1792. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.02.119
- Balercia, G., Regoli, F., Armeni, T., Koverech, A., Mantero, F., i Boscaro, M. (2005). Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertility and sterility*, 84(3), 662-671. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.03.064
- Barbagallo, F., La Vignera, S., Cannarella, R., Aversa, A., Calogero, A. E., i Condorelli, R. A. (2020). Evaluation of Sperm Mitochondrial Function: A Key Organelle for Sperm Motility. *Journal of clinical medicine*, 9(2), 363. doi:10.3390/jcm9020363

- Bonet, S., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., García-Gil, i N., Badia, E. (2000). *Morfologia espermàtica en porcí/ Morfologia espermática en porcino/ Morphology of boar spermatozoa*. Institut d'Estudis Catalans.
- Dcunha, R., Hussein, R. S., Ananda, H., Kumari, S., Adiga, S. K, Kannan, N., Zhao, Y., i Kalthur, G. (2020). Current Insights and Latest Updates in Sperm Motility and Associated Applications in Assisted Reproduction. *Reproductive Sciences*, 1 - 19. doi: s10.1007/s43032-020-00408-y
- Fisch, J. D., Behr, B., i Conti, M. (1998). Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors. *Human reproduction*, 13(5), 1248-1254. doi: 10.1093/humrep/13.5.1248
- Flores, V. (2015). La fecundación. *Embriología Humana: Bases moleculares y celulares de la histogénesis, la morfogénesis y las alteraciones del desarrollo* (p. 1-30). Editorial Medica Panamericana.
- Freitas, M. J., Vijayaraghavan, S., i Fardilha, M. (2017). Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of Reproduction*, 96(1), 2-12. doi: 10.1095/biolreprod.116.144337
- Grassi, G., Cappello, N., Gheorghe, M. F., Salton, L., Di Bisceglie, C., Manieri, C., i Benedetto, C. (2010). Exogenous platelet-activating factor improves the motility of human spermatozoa evaluated with C.A.S.A.: optimal concentration and incubation time. *Journal of endocrinological investigation*, 33(10), 684-690. doi: 10.1007/BF03346670
- Henkel, R. R. i Schill, W. B. (2003). Sperm preparation for ART. *Reproductive biology and endocrinology*, 1, 108. doi: 10.1186/1477-7827-1-108
- Hong, C. Y., Chiang, B. N., Ku, J., Wei, Y. H., i Fong, J. C. (1985). Calcium antagonists stimulate sperm motility in ejaculated human semen. *British journal of clinical pharmacology*, 19(1), 45-49. doi: 10.1111/j.1365-2125.1985.tb02611.x
- Imoedemhe, D. A., Sique, A. B., Pacpaco, E. L., i Olazo, A. B. (1992). The effect of caffeine on the ability of spermatozoa to fertilize mature human oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 9, 155-160. doi: 10.1007/BF01203756.
- Inaba, K. (2011). Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Molecular human reproduction*, 17(8), 524-538. doi: 10.1093/molehr/gar034.
- Kalthur, G., Salian, S. R., Keyvanifard, F., Sreedharan, S., Thomas, J. S., Kumar, P., i Adiga, S. K. (2012). Supplementation of biotin to sperm preparation medium increases the motility and longevity in cryopreserved human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(7), 631-635. doi:10.1007/s10815-012-9760-8
- Kay, V. J., Coutts, J. R., i Robertson, L. (1993). Pentoxifylline stimulates hyperactivation in human spermatozoa. *Human reproduction*, 8(5), 727-731. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138129

- Kervancioglu, M. E., Djahanbakhch, O., i Aitken, R. J. (1994). Epithelial cell coculture and the induction of sperm capacitation. *Fertility and sterility*, 61(6), 1103-1108. doi: 10.1016/s0015-0282(16)56764-8
- Kervancioglu, M. E., Saridogan, E., Aitken, R. J., i Djahanbakhch, O. (2000). Importance of sperm-to-epithelial cell contact for the capacitation of human spermatozoa in fallopian tube epithelial cell cocultures. *Fertility and sterility*, 74(4), 780-784. doi: 10.1016/s0015-0282(00)01514-4
- Khaleghi, S., Bakhtiari, M., Asadmobini, A., i Esmaili, F. (2017). Tribulus terrestris Extract Improves Human Sperm Parameters In Vitro. *Journal of Evidence-based Complementary & Alternative Medicine*, 22(3), 407-412. doi: 10.1177/2156587216668110
- King S. M. (2016). Axonemal Dynein Arms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(11), a028100. doi: 10.1101/cshperspect.a028100
- Krausz, C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 25(2), 271-285. doi: 10.1016/j.beem.2010.08.006
- de Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., i Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Human Reproduction*, 13(Suppl 1), 1-8. doi: 10.1093/humrep/13.suppl_1.1
- Lefièvre, L., De Lamirande, E., i Gagnon, C. (2000). The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *Journal of andrology*, 21(6), 929-237. doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03424.x
- Lenzi, A., Lombardo, F., Sgrò, P., Salacone, P., Caponecchia, L., Dondero, F., i Gandini, L. (2003). Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertility and sterility*, 79(2), 292-300. doi: 10.1016/s0015-0282(02)04679-4
- Lindemann, C. B., i Kanous, K. S. (1989). Regulation of mammalian sperm motility. *Archives of andrology*, 23(1), 1-22. doi: 10.3109/01485018908986783
- Llei 32/2007, de 7 de novembre, per a la cura dels animals, en la seva explotació, transport, experimentació i sacrifici. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 8 de novembre de 2007, núm. 268, p. 45914-45920.
- McBrinn, R. C., Fraser, J., Hope, A. G., Gray, D. W., Barratt, C. L. R., Martins da Silva, S. J., i Brown, S. G. (2019). Novel pharmacological actions of trequinsin hydrochloride improve human sperm cell motility and function. *British Journal of Pharmacology*, 176(23), 4521 - 4536. doi: 10.1111/bph.14814
- Mendeluk, G., i Rosales, M. (2016). Thyroxin Is Useful to Improve Sperm Motility. *International Journal of Fertility & Sterility*, 10(2), 208 - 214. doi: 10.22074/ijfs.2016.4911
- Moussa, M. M. (1983). Caffeine and sperm motility. *Fertility and sterility*, 39(6), 845-848. doi: 10.1016/s0015-0282(16)47128-1

- Nabi, A., Khalili, M. A., Fesahat, F., Talebi, A., i Ghasemi-Esmailabad, S. (2017). Pentoxifylline increase sperm motility in devitrified spermatozoa from asthenozoospermic patient without damage chromatin and DNA integrity. *Cryobiology*, 76, 59-64. doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.008.
- Nowicka-Bauer, K., i Nixon, B. (2020). Molecular Changes Induced by Oxidative Stress that Impair Human Sperm Motility. *Antioxidants*, 9(2), 134. doi: 10.3390/antiox9020134.
- O'Flaherty, C. (2019). Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. *Andrology*, 7(5), 662-668. doi: 10.1111/andr.12630
- Oiwa, K., Sakakibara, H., i Furuta, K. (2018). *Dyneins: Structure, Biology and Disease*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809470-9.00001-1>
- Ollero, M., Gil-Guzman, E., López, M. C., Sharma, R. K., Agarwal, A., Larson, K., Evenson, D., Thomas, A. J. Jr., i Álvarez, J. G. (2001). Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human reproduction*, 16(9), 1912-1921. doi: 10.1093/humrep/16.9.1912
- Omu, A., Al-Azemi, M. K., Kehinde, E., Anim, J. T., Oriowo, M. A., i Mathew, T. (2008). Indications of the Mechanisms Involved in Improved Sperm Parameters by Zinc Therapy. *Medical Principles and Practice*, 17(2), 108 - 116. doi: 10.1159/000112963
- Paoli, D., Gallo, M., Rizzo, F., Baldi, E., Francavilla, S., Lenzi, A., Lombardo, F., i Gandini, L. (2011). Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertility and sterility*, 95(7), 2315-2319. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.03.059
- Papale, L., Fiorentino, A., Montag, M., i Tomasi, G. (2012). The zygote. *Human reproduction*, 27(Suppl 1), i22-i49. doi: 10.1093/humrep/des205
- Papas, M., Arroyo, L., Bassols, A., Catalán, J., Bonilla-Correal, S., Gacem, S., Yeste, M., i Miró, J. (2019). Activities of antioxidant seminal plasma enzymes (SOD, CAT, GPX and GSR) are higher in jackasses than in stallions and are correlated with sperm motility in jackasses. *Theriogenology*, 140, 180-187. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.08.032.
- Peña, F. J. (2020). Molecular Biology of Spermatozoa. *Int J Mol Sci*, 21(9), 3060. doi: 10.3390/ijms21093060
- Pereira, R., Sá, R., Barros, A., i Sousa, M. (2017). Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian Journal of Andrology*, 19(1), 5 - 14. doi: 10.4103/1008-682X.167716
- Pigino, G., i Ishikawa, T. (2012). Axonemal radial spokes: 3D structure, function and assembly. *Bioarchitecture*, 2(2), 50-58. doi: 10.4161/bioa.20394

Piomboni, P., Gambera, L., Serafini, F., Campanella, G., Morgante, G., i De Leo, V. (2008). Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. *Asian journal of andrology*, 10(2), 201-206. doi: 10.1111/j.1745-7262.2008.00356.x.

Real Decret 53/2013, d'1 de febrer, pel qual s'estableixen les normes bàsiques aplicables per a la protecció dels animals utilitzats en experimentació i altres fins científics, incloent-hi la docència. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 8 de febrer de 2013, núm. 34, p. 11370-11421.

Reinhardt, J. C, Cui, X., i Roudebush, W. E. (1999). Immunofluorescent evidence of the platelet-activating factor receptor on human spermatozoa. *Fertility and sterility*, 71(5), 941-942. doi: 10.1016/s0015-0282(99)00096-5

Ribas-Maynou, J., i Yeste, M. (2020). Oxidative Stress in Male Infertility: Causes, Effects in Assisted Reproductive Techniques, and Protective Support of Antioxidants. *Biology*, 9(4), 77. doi: 10.3390/biology9040077

Ricker, D. D., Minhas, B. S, Kumar, R., Robertson, J. L., i Dodson, M. G. (1989). The effects of platelet-activating factor on the motility of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 52(4), 655-658. doi: 10.1016/s0015-0282(16)60981-0

Roudebush, W. E., i Purnell, E. T. (2000). Platelet-activating factor content in human spermatozoa and pregnancy outcome. *Fertility and sterility*, 74(2), 257-260. doi: 10.1016/s0015-0282(00)00646-4

Safarinejad, M. R. (2011). Effect of pentoxifylline on semen parameters, reproductive hormones, and seminal plasma antioxidant capacity in men with idiopathic infertility: a randomized double-blind placebo-controlled study. *International Urology and Nephrology*, 43, 315-328. doi: 10.1007/s11255-010-9826-4

Sakkas, D., i Alvarez, J. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and sterility*, 93(4), 1027-1036. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.046.

Sathananthan, A. H., Ratnam, S. S., Ng, S. C., Tarín, J. J., Gianaroli, L., i Trounson, A. (1996). The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. *Human reproduction*, 11(2), 345-356. doi: 10.1093/humrep/11.2.345

Sengoku, K., Tamate, K., Takaoka, Y., i Ishikawa, M. (1993). Effects of platelet activating factor on human sperm function in vitro. *Human reproduction*, 8(9), 1443-1447. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138276

Sigman, M., Glass, S., Campagnone, J., i Pryor, J. L. (2006). Carnitine for the treatment of idiopathic asthenospermia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Fertility and sterility*, 85(5), 1409-1414. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.10.055

Siow, Y., Fallat, M. E., Amin, F. A., i Belker, A. M. (1998). Müllerian inhibiting substance improves longevity of motility and viability of fresh and cryopreserved sperm. *Journal of andrology*, 19(5), 568-572. doi: 10.1002/j.1939-4640.1998.tb02058.x

Steegborn, C. (2014). Structure, mechanism, and regulation of soluble adenylyl cyclases - similarities and differences to transmembrane adenylyl cyclases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(12 Pt B), 2535-2547. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.08.012

Tardif, S., Madamidola, O. A., Brown, S., Frame, L., Lefièvre, L., Wyatt, P., Barratt, C., i Silva, S. J. (2014). Clinically relevant enhancement of human sperm motility using compounds with reported phosphodiesterase inhibitor activity. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 29(10), 2123 - 2135. doi: 10.1093/humrep/deu196

Terriou, P., Hans, E., Cortvrindt, R., Avon, C., Charles, O., Salzmann, J., Lazdunski, P., i Giorgetti, C. (2015). Papaverine as a replacement for pentoxifylline to select thawed testicular or epididymal spermatozoa before ICSI. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*, 43(12), 786-790. doi: 10.1016/j.gyobfe.2015.10.007

Turner, R. M. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, fertility, and development*, 18(2), 25-38. doi: 10.1071/rd05120

Tsounapi, P., Honda, M., Dimitriadis, F., Koukos, S., Hikita, K., Zachariou, A., Sofikitis, N., i Takenaka, A. (2018). Effects of a micronutrient supplementation combined with a phosphodiesterase type 5 inhibitor on sperm quantitative and qualitative parameters, percentage of mature spermatozoa and sperm capacity to undergo hyperactivation: A randomised controlled trial. *Andrologia*, 50(8), e13071. doi: 10.1111/and.13071

Wang, W. L., Tu, C. F., i Tan, Y. Q. (2020). Insight on multiple morphological abnormalities of sperm flagella in male infertility: what is new? *Asian Journal of Andrology*, 22(3), 236 - 245. doi: 10.4103/aja.aja_53_19

World Health Organization (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed. WHO Press. Recuperat el 02/04/2021, de <https://www.who.int/publications/i/item/9789241547789>

World Health Organization (2017). Fact sheets on sustainable development goals: health targets. Sexual and Reproductive Health. 1-7. Recuperat el 16/02/2021, de https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/348008/Fact-sheet-SDG-SRH-FINAL-04-09-2017.pdf?ua=1

World Health Organization (2020). Infertility. Recuperat el 17/02/2021, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., i Vanderpoel, S. (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1520-1524. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.09.009