



ESTUDIO DE LA FIABILIDAD QUE OFRECEN DIFERENTES TÉCNICAS DE ANÁLISIS IN VITRO DE LA VITALIDAD Y MOTILIDAD ESPERMÁTICAS, PARA UNA EVALUACIÓN PRECISA DE LA CALIDAD DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE VERRACO

Jesús Peláez, Elizabeth Breininger¹, Beatriz Alegre, Fernando J. Peña y Juan Carlos Domínguez²

Dres. en Veterinaria. Departamento de Patología Animal (Sanidad Animal). Unidad de Reproducción y Obstetricia. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. Campus de Vegazana, s/n. 24071 León.

¹Licenciada en Veterinaria. Área de Química Biológica. Biotecnología de la Reproducción. Facultad de Veterinaria. Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280 (C1427CWO). Buenos Aires, Argentina.

²Autor para correspondencia: Tfno.: 987 291324; Fax: 987 291304; e-mail: dsajdf@unileon.es

RESUMEN

La precisión en la evaluación de la calidad del semen criopreservado de verraco que puede obtenerse analizando la vitalidad y la motilidad espermáticas se estudió en 22 eyaculados congelados considerando los siguientes aspectos: porcentaje de espermatozoides móviles con y sin estimulación por cafeína, porcentaje de espermatozoides vivos con los fluorocromos yoduro de propidio y Hoechst 33258, y termorresistencia. Se encontró que el porcentaje de espermatozoides móviles bajo estimulación por cafeína, y el porcentaje de espermatozoides vivos vulvulado con el fluorocromo yoduro de propidio, estimaban la calidad seminal de forma más precisa que el resto de parámetros analizados, pero el seguimiento de la motilidad espermática a lo largo de un periodo de incubación a 37°C contribuye en mayor medida al conocimiento de la calidad seminal con implicaciones prácticas.

ABSTRACT

The accuracy of the information provided by the assessment of vitality and motility in cryopreserved boar semen was studied in 22 frozen ejaculates focusing on the following aspects: motility with and without stimulation by caffeine, plasma membrane integrity evaluated with both Propidium iodide and Hoechst 33258, and thermoresistance. We found that the evaluation of motility with caffeine, and the evaluation of live spermatozoa with propidium iodide, led to a more accurate estimation of semen quality than did the other studied parameters, although monitoring motility throughout a period of incubation at 37 °C contributes to a better knowledge on semen quality with practical implications.



ESTUDIO DE LA FIABILIDAD QUE OFRECEN DIFERENTES TÉCNICAS DE ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA VITALIDAD Y MOTILIDAD ESPERMÁTICAS, PARA UNA EVALUACIÓN PRECISA DE LA CALIDAD DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE VERRACO

INTRODUCCIÓN

La evaluación de la supervivencia espermática tras el proceso de criopreservación resulta esencial para el conocimiento de la calidad seminal. Con este propósito se estudian frecuentemente la motilidad y la vitalidad inmediatamente después de la descongelación. No obstante, se hace necesario saber si la información que ambos parámetros proporcionan es suficientemente precisa, pues pudiera ocurrir que determinados espermatozoides se mostraran inmóviles a pesar de no haber perdido verdaderamente la capacidad para el movimiento, o que la técnica utilizada en el análisis de la vitalidad fuera inadecuada o insuficientemente sensible. Prueba de ello es que a menudo se encuentran espermatozoides vivos e inmóviles en semen criopreservado, a juzgar por el incremento de motilidad que se registra cuando la muestra se incuba en presencia de agentes estimulantes de dicha función^{1,4} y que en el estudio de la vitalidad pueden constatarse problemas de coloración parcial⁵, sobreestimación de la población de espermatozoides muertos^{6,7}, y discrepancias entre colorantes⁸⁻¹². El objetivo de este trabajo, entonces, es examinar la fiabilidad que ofrecen determinadas técnicas de análisis de la vitalidad y la motilidad en el estudio de la supervivencia espermática post-descongelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Veintidós eyaculados, obtenidos de once verracos diferentes, fueron utilizados en el estudio, congelándose en pajuelas de 0,25 ml conforme al procedimiento descrito por Bwanga et al.¹³. Inmediatamente después de la descongelación, el semen fue diluido (1:20) en BTS a 37°C, y se analizaron la motilidad y la vitalidad. Cinco eyaculados representativos, entonces, fueron sometidos a un test de termorresistencia, en el que se efectuó un seguimiento de la motilidad y la vitalidad para evaluar más en profundidad la utilidad de ambos parámetros como criterio de calidad seminal. Los análisis se realizaron por triplicado, obteniéndose la media y la desviación estándar (DE) para el estudio estadístico.

Evaluación de la vitalidad inmediatamente después de la descongelación

Se emplearon los fluorocromos Hoechst 33258 y yoduro de propidio (PI).

Para la evaluación con Hoechst 33258, se siguió el procedimiento descrito por Berger¹⁴, ligeramente modificado. Así, el semen, una vez descongelado y diluido, fue lavado mediante doble centrifugación (500 x g, 5 minutos) a temperatura ambiente. La pastilla final de espermatozoides se resuspendió en 10 ml de BTS, tomándose 1 ml de la suspensión para la coloración con el fluorocromo, que se efectuó añadiendo 10 µl de una solución (en agua ultrapura Milli-Q) 1:1000 de Hoechst 33258 (concentración original: 100 mg/ml; concentración final: 1 mg/ml). La muestra fue incubada durante 3 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, y se lavó a continuación mediante centrifugación (500 x g, 6 minutos) en 4 ml de una solución (2% en PBS) de polivinilpirrolidona (peso molecular medio: 40.000). Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 ml de etanol al 95%, fijándose en la oscuridad a 4°C durante 30 minutos. Una alícuota de 15 ml fue colocada en un portaobjetos, se dejó secar, y se cubrió con una solución [en glicerol: PBS (9:1)] 0,22 M de DABCO. Se depositó un cubreobjetos, y se observó la preparación a 1.000 aumentos en un microscopio de epifluorescencia, bajo excitación por luz ultravioleta (340-380 nm; emisión a 425 nm). Trescientos espermatozoides fueron observados, y se calcularon los porcentajes de las diferentes categorías de espermatozoides identificados.

La coloración con PI se efectuó conforme al procedimiento descrito por Harrison y Vickers¹⁵, también ligeramente modificado. Brevemente, se preparó una solución colorante de PI [10 µl de una solución stock de PI (0,5 mg/ml en solución salina isotónica) + 20 µl de una solución de formaldehído (2,5 mg/ml en agua ultrapura Milli-Q) + 1 ml de BTS], y se mezclaron 200 µl de la misma con 50 µl de la suspensión de espermatozoides. Tras 5 minutos de incubación en la oscuridad a temperatura ambiente, se dispusieron 3 alícuotas de 5 µl entre porta y cubre, y se observaron a 1.000 aumentos en el microscopio de epifluorescencia, en este caso bajo excitación por luz verde (515-560 nm; emisión a 590 nm). Al menos cien espermatozoides fueron observados en cada alícuota, calculándose los porcentajes de las categorías de espermatozoides identificadas. El valor medio de las tres alícuotas proporcionaba el dato de vitalidad para el replicado en cuestión.

Evaluación de la motilidad inmediatamente después de la descongelación

Se consideró la evaluación del porcentaje de espermatozoides espontáneamente móti-



les y de la motilidad bajo estimulación por cafeína. Para ello, la suspensión de espermatozoides descongelados fue incubada a 37°C durante 10 minutos, calculándose entonces la motilidad espontánea. El porcentaje de espermatozoides móviles en presencia de cafeína se obtuvo tras 5 minutos de incubación adicional en una solución (en BTS) 5 mM de dicha sustancia. En uno y otro caso se dispusieron tres alícuotas de 5 µl entre porta y cubre atemperados, y se contabilizaron 100-150 espermatozoides por alícuota a 400 aumentos en un microscopio de contraste de fases. Se llevó a cabo una estimación objetiva utilizándose un contador celular, con el que los espermatozoides se clasificaban como "móviles/inmóviles" atendiendo a la presencia/ausencia de movimiento en el flagelo. La media de las tres alícuotas proporcionaba el dato de motilidad para el replicado en cuestión.

Test de termorresistencia

Para cada uno de los replicados efectuados se descongelaron tres pajuelas del eyaculado a analizar, diluyéndose como se describió anteriormente, e incubándose a 37°C por espacio de 4 horas. A los 10 minutos y primera hora de incubación, e intervalos de una hora a partir de entonces, se evaluó la motilidad con y sin estimulación por cafeína, así como la vitalidad con el fluorocromo PI.

Análisis estadístico

Se realizó con el software STATISTICA para windows (versión 4.5, 1993), diseñándose conforme a las especificaciones dadas por Carrasco¹⁶ y el manual de usuario del software. Cuando el estudio de una variable en particular conllevaba comparar menos de 30 casos, se analizó previamente el ajuste de la serie de datos a la distribución normal empleándose el test de Shapiro-Wilk.

En el estudio de la motilidad y la vitalidad inmediatamente después de la descongelación, definimos un parámetro de criorresistencia llamado "criotolerancia", y consideramos que la motilidad y la vitalidad eran diferentes expresiones de este mismo parámetro. Las dos medidas de motilidad (con y sin cafeína), y las dos medidas de vitalidad (con Hoechst 33258 y con PI), proporcionaban entonces cuatro diferentes medidas de supervivencia espermática para el parámetro "criotolerancia". Las series de datos se incluyeron así en un modelo mixto de ANOVA de dos vías, en el que el factor "criotolerancia" fue tratado como efecto fijo con medidas repetidas.

Para el test de termorresistencia, se estudiaron en primer lugar diferencias entre los valores de motilidad con y sin cafeína en cada eyaculado a lo largo del periodo de incubación. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías, y las dos variables (tiempo y motilidad) se consideraron factores de efectos fijos con medidas repetidas. Se obtuvo entonces una sola serie de datos de motilidad, y el estudio de la termorresistencia se basó en la evolución de las proporciones relativas de espermatozoides vivos y espermatozoides móviles. Las series de datos de todos los eyaculados se incluyeron en un modelo de efectos mixtos de ANOVA de tres vías, con idénticas especificaciones para las variables "tiempo" y "criterio de supervivencia espermática" (= motilidad o vitalidad).

Todas las comparaciones *a posteriori* se llevaron a cabo utilizando el test de Student-Newman-Keuls.

RESULTADOS

Vitalidad y motilidad inmediatamente después de la descongelación

Dos categorías de espermatozoides se observaron en el estudio de la vitalidad: "muertos", exhibiendo intensa fluorescencia azul (en la evaluación con Hoechst 33258) o roja (en la evaluación con PI) en todo o parte de la cabeza espermática, y "vivos", sin fluorescencia, denominados como tal por ser la exclusión del colorante un criterio indicativo de integridad de la membrana plasmática. La utilización de uno u otro fluorocromo, sin embargo, proporcionaba resultados de vitalidad diferentes en muchos eyaculados. Los datos han quedado recogidos en la **tabla I**. Se observa cómo la mayoría de los eyaculados muestran importantes diferencias entre fluorocromos, aunque dicha diferencia es significativa sólo en la mitad de las muestras, probablemente a consecuencia del modelo estadístico utilizado. Escogimos entonces la evaluación con PI como dato de vitalidad más fiable, lo que discutiremos más adelante para justificar esta elección.

La **figura 1**, por su parte, representa los porcentajes de motilidad espermática observados en cada eyaculado en presencia o ausencia de cafeína, acompañándose de los porcentajes de espermatozoides vivos encontrados con el fluorocromo PI. Se observa que la adición de cafeína incrementa significativamente la motilidad en 13 de los 22 eyaculados, y que los valores de motilidad en ausencia de esta sustancia (8-56%) son significativamente menores que los de vitali-



ESTUDIO DE LA FIABILIDAD QUE OFRECEN DIFERENTES TÉCNICAS DE ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA VITALIDAD Y MOTILIDAD ESPERMÁTICAS, PARA UNA EVALUACIÓN PRECISA DE LA CALIDAD DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE VERRACO

TABLA I

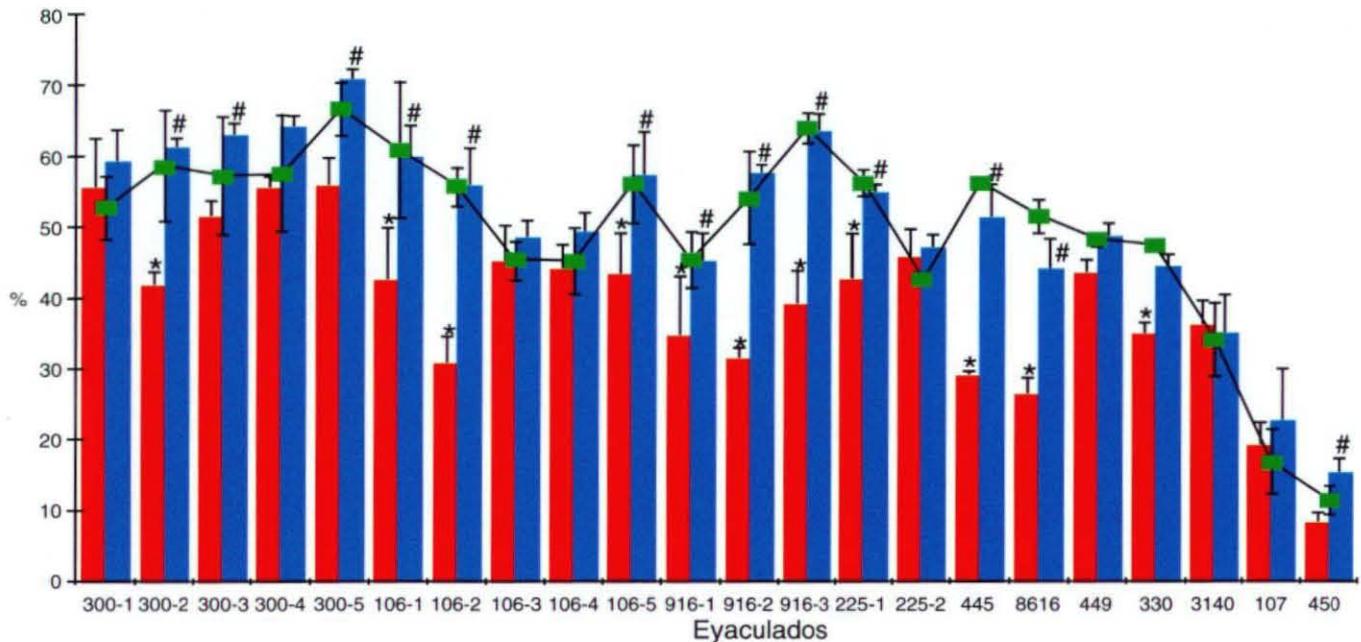
PORCENTAJE (MEDIA ± DE) DE ESPERMATOZOIDES VIVOS OBTENIDOS CON LOS FLUOROCROMOS YODURO DE PROPIDIO (PI) O HOECHST 33258 (H) EN LOS DIFERENTES EYACULADOS EVALUADOS (300#; 106#; 916#; 225#; 445; 8616; 449; 330; 3140; 107; 450)

	VIT	
	PI ¹	H ¹
300-1	52,67 ± 4,51	65,73 ± 1,02*
300-2	58,43 ± 7,74	70,17 ± 1,62*
300-3	57,13 ± 8,31	68,23 ± 2,70*
300-4	57,47 ± 8,14	69,30 ± 6,38 *
300-5	66,67 ± 3,81	71,87 ± 3,11
106-1	60,80 ± 9,69	68,17 ± 8,22
106-2	55,70 ± 2,79	68,27 ± 3,23 *
106-3	45,30 ± 2,64	57,47 ± 0,25 *
106-4	45,13 ± 4,66	55,13 ± 3,65
106-5	56,00 ± 5,57	68,53 ± 1,53 *
916-1	45,33 ± 3,95	52,20 ± 0,87
916-2	54,03 ± 6,51	65,27 ± 1,01
916-3	63,87 ± 2,20	67,30 ± 1,23
225-1	56,10 ± 1,82	66,33 ± 3,87
225-2	42,57 ± 0,23	56,73 ± 3,76 *
445	56,10 ± 0,35	59,53 ± 1,10
8616	51,37 ± 2,31	60,73 ± 2,27
449	48,13 ± 0,98	57,00 ± 1,15
330	47,33 ± 0,91	59,27 ± 3,95*
3140	34,00 ± 5,16	50,80 ± 3,22*
107	16,80 ± 4,62	29,83 ± 0,29*
450	11,43 ± 2,01	18,80 ± 2,85

#: los números consecutivos indican diferentes eyaculados de un mismo verraco.

¹: no se muestran posibles diferencias significativas entre eyaculados.

*: significativamente diferente (p < 0,05) del valor obtenido con PI.



¹: no se muestran posibles diferencias significativas entre eyaculados.

²: donde no aparecen barras de error, su tamaño es menor que el del símbolo.

*: significativamente diferente ($p < 0.05$) del correspondiente valor de vitalidad.

#: Significativamente diferente ($p < 0.05$) del correspondiente valor de motilidad sin estimulación por cafeína.

Figura 1. Porcentaje¹ de espermatozoides móviles evaluados en presencia (columna derecha) o ausencia (columna izquierda) de cafeína (media + DE), y porcentaje² de espermatozoides vivos (; media ± DE) observados en los diferentes eyaculados criopreservados.

dad (11-67%) en la mitad de las muestras, pero similares a los de este parámetro cuando se evalúan en su presencia (15-71%). La motilidad bajo estimulación por cafeína, entonces, proporcionaba más fiabilidad en la evaluación de esta característica, como se discutirá también más adelante.

Test de termorresistencia

Los cinco eyaculados escogidos para la realización de este test fueron los denominados

como 300-5, 916-3, 445, 330 y 107, en base a las similitudes/diferencias de calidad que podía considerarse existían entre ellos.

En el estudio de las diferencias entre valores de motilidad en presencia y ausencia de cafeína en cada eyaculado, se encontró que a las 0, 1 y 2 horas de incubación, el porcentaje de espermatozoides móviles bajo estimulación por cafeína resultaba ser similar o significativamente superior al observado en la alícuota no estimulada, según el eyacula-



ESTUDIO DE LA FIABILIDAD QUE OFRECEN DIFERENTES TÉCNICAS DE ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA VITALIDAD Y MOTILIDAD ESPERMÁTICAS, PARA UNA EVALUACIÓN PRECISA DE LA CALIDAD DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE VERRACO

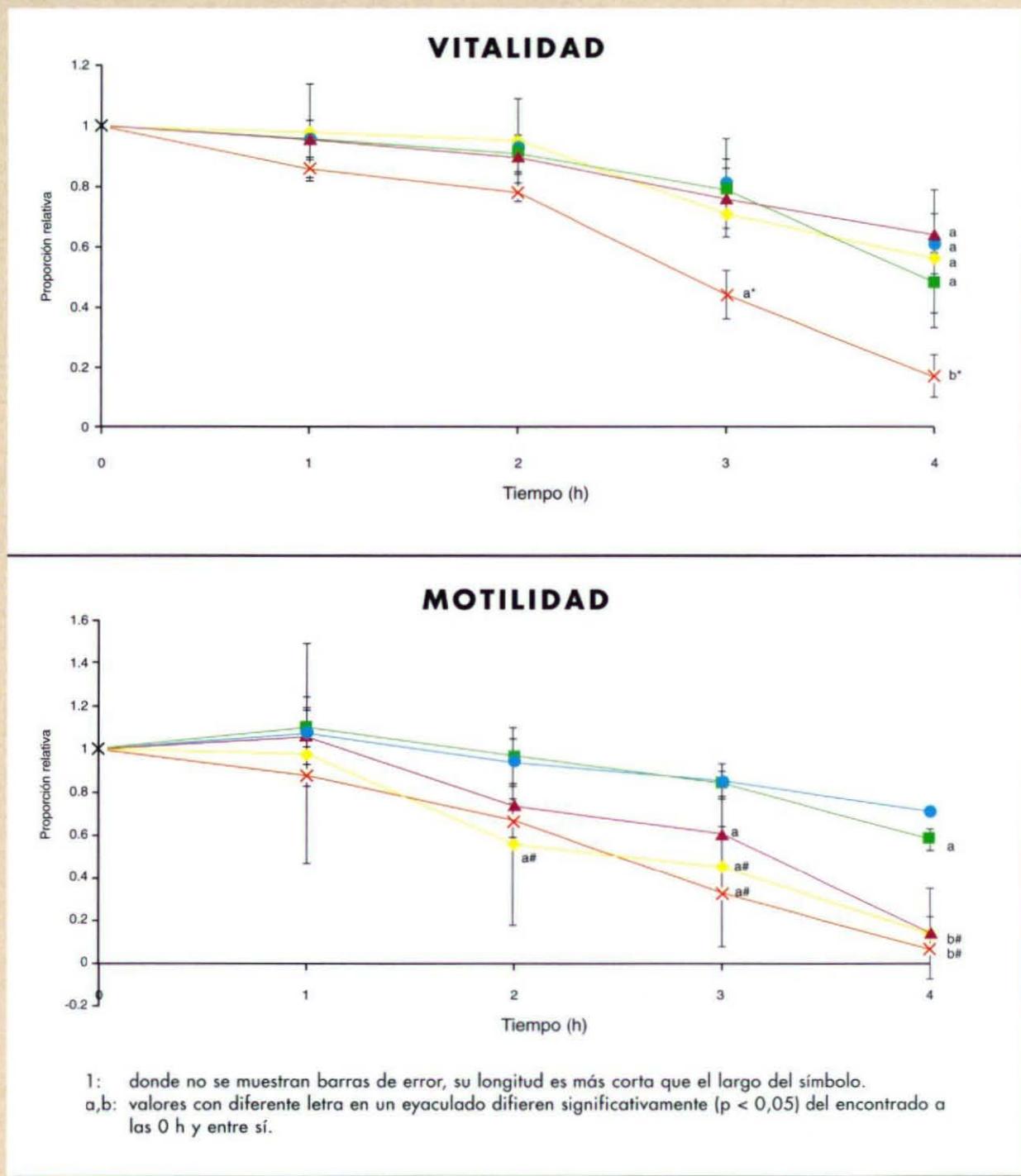


Figura 2. Evolución de las proporciones relativas (media \pm DE) de espermatozoides vivos (vitalidad) y mótils (motilidad) observados en cinco eyaculados (916-3: ■ 312: ▲ 107: ● 445: ● 300-5: ● x) incubados a 37°C en BTS.



do, pero que a las 3 o 4 horas existía un efecto detrimental de dicha sustancia en casi todas las muestras (datos no mostrados). Así pues, para la serie de datos de motilidad, se tomaron los obtenidos en presencia de cafeína a las 0, 1 y 2 horas de incubación, y en ausencia de la misma a las 3 y 4 horas, como resulta lógico.

En la **figura 2**, entonces, se muestra la evolución de las proporciones relativas de espermatozoides vivos y espermatozoides móviles en cada eyaculado. Tanto una como otra se redujeron en todos los eyaculados a lo largo del periodo de incubación, si bien, la intensidad de los cambios no ocurrió de manera acorde con la calidad de la muestra, como puede apreciarse en la figura. En los eyaculados 330 y 107, por su parte, la evolución de la motilidad permitió establecer diferencias de crioresistencia entre esas muestras y otros eyaculados que no podían ser constatadas practicando únicamente el seguimiento de la vitalidad. Uno y otro parámetro, por tanto, contribuyen a "matizar" la información sobre crioresistencia que aporta el estudio de la calidad inmediatamente después de la descongelación, pero con diferente grado de precisión.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se aportan evidencias de que la elección de un parámetro adecuado de evaluación es importante en el estudio de la calidad del semen criopreservado. Tanto la motilidad como la vitalidad, cuando se evalúan inmediatamente después de la descongelación, informan sobre el porcentaje de espermatozoides supervivientes al proceso, pero la técnica escogida para la evaluación de estas características puede afectar la precisión de los datos. En nuestro estudio, por ejemplo, en muchos eyaculados, el PI identificó un porcentaje de espermatozoides muertos significativamente superior al que proporcionaba la evaluación con Hoechst 33258, y la motilidad espontánea resultaba ser una medida menos precisa de supervivencia espermática que la motilidad bajo estimulación por cafeína.

Los resultados discrepantes de vitalidad sugieren que existen diferencias de capacidad entre colorantes para la detección de espermatozoides vivos/muertos, como ya apuntaban los trabajos de otros autores anteriormente mencionados⁸⁻¹², Valcárcel et al.¹¹ consideran que el colorante que identifica mayor número de espermatozoides muertos resulta más sensible, pero se ha de tener en cuenta que cierta toxicidad puede estar presente en muchas de estas sustan-

cias⁷, con lo que las discrepancias en los resultados también podrían atribuirse a diferencias en la toxicidad de los colorantes. Esta posibilidad, no obstante, parece no ser la responsable de los hallazgos de nuestro estudio, pues la concentración de PI que utilizamos (1 µg/ml) es claramente inferior a la empleada en los trabajos anteriores (4-7 µg/ml), con lo que el riesgo de toxicidad habría disminuido considerablemente. Sin embargo, cabe la posibilidad de que la coloración con Hoechst 33258 no haya sido lo suficientemente sensible, por considerarse que existen en ella problemas inherentes a la técnica, consistentes en que la membrana plasmática de los espermatozoides moribundos se muestra a menudo impermeable al colorante, haciendo que éstos sean clasificados como "espermatozoides vivos"¹⁷. Los datos aportados por el PI en nuestro trabajo, por tanto, parecen ser más fiables, y la evaluación con este fluorocromo resulta ser entonces un mejor indicador de vitalidad.

De las diferencias encontradas entre vitalidad y motilidad espontánea en nuestro trabajo, puede deducirse que entre un 20% y un 50% de los espermatozoides vivos eran inmóviles. Esta observación refleja que si la motilidad espontánea es el único parámetro utilizado para la evaluación de la supervivencia espermática, la estimación de esta característica puede resultar un tanto imprecisa. Por el contrario, la motilidad bajo estimulación por cafeína aporta la misma precisión que la vitalidad en el estudio de dicha característica, pues no se encontraron diferencias significativas entre los valores de uno y otro parámetro en ninguno de los eyaculados. La cafeína y otros inhibidores de la fosfodiesterasa han demostrado ser de gran utilidad para la evaluación de la motilidad en semen congelado^{2,3}. En espermatozoides que han experimentado un proceso de enfriamiento o criopreservación puede existir un bajo estado metabólico¹⁸, o concentraciones intracelulares de Ca²⁺ elevadas¹⁹⁻²¹. Ambas situaciones repercuten negativamente en la motilidad^{22,23}, y podrían ser la causa de una recuperación incompleta de esta función tras la descongelación, pero pueden ser también revertidas eficazmente con la adición de cafeína a la suspensión espermática²²⁻²⁶. La utilización de cafeína u otras sustancias estimulantes, entonces, se revela necesaria para una evaluación precisa de la supervivencia espermática basada en la motilidad.

El estudio de la termorresistencia, finalmente, revela que la calidad seminal evaluada inmediatamente después de la descongelación proporciona información sobre el porcentaje de esperma-



ESTUDIO DE LA FIABILIDAD QUE OFRECEN DIFERENTES TÉCNICAS DE ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA VITALIDAD Y MOTILIDAD ESPERMÁTICAS, PARA UNA EVALUACIÓN PRECISA DE LA CALIDAD DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE VERRACO

tozoides supervivientes al proceso de criopreservación, pero no acerca de las posibilidades de supervivencia en el tracto genital femenino. La incubación a 37°C imita hasta cierto punto las condiciones que el espermatozoide encontrará en dicho tracto²⁷, y por lo general provoca un deterioro progresivo de la calidad seminal^{13,28-31}. En nuestro estudio, encontramos que las proporciones iniciales de vitalidad y motilidad podían ser mantenidas prácticamente sin modificaciones durante 1 o 2 horas, respectivamente, pero los cambios posteriores en estas características ocurrieron sin guardar relación aparente con la calidad inicial del eyaculado: muestras con diferencias de calidad (916-3, 445, 330, 107) exhibían capacidades similares de resistencia, y eyaculados de buena calidad (3100-5) mostraban baja capacidad de termoresistencia. Como el deterioro de la motilidad resultaba ser más pronunciado que el de la vitalidad en algunos eyaculados, dicho parámetro contribuía a establecer diferencias de termoresistencia de manera más eficaz. La pérdida de motilidad durante incubación *in vitro* ha sido relacionada con daños en la estructura de la membrana plasmática³², así como con la presencia de factores inmovilizantes en espermatozoides con membrana plasmática intacta¹¹. Uno y otro mecanismos podrían estar presentes en nuestro estudio, y el segundo de ellos podría explicar por qué la motilidad sería más discriminante que la vitalidad.

En conclusión, el estudio de la calidad seminal postdescongelación requiere utilizar parámetros precisos de evaluación. Puede obtenerse información fiable al respecto evaluando la motilidad espermática en presencia de agentes estimulantes como la cafeína, o la vitalidad con fluorocromos como el yoduro de propidio, pero el seguimiento de la motilidad, más que de la vitalidad, a lo largo de un periodo de incubación a 37°C durante varias horas, aportaría un conocimiento más exacto de la calidad del eyaculado para su utilización *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

J. Peláez fue beneficiario de becas concedidas por la Junta de Castilla y León y la Universidad de León para la realización de este trabajo. Financiación adicional fue proporcionada por la Junta de Castilla y León (código proyecto: LE 11/99). Se agradece la colaboración prestada por E. Sáinz, I. Reguera, y C. González durante las sesiones de congelación de semen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Domínguez JC, Anel L, Boixo JC, Abad M. Influencia de la cafeína sobre la motilidad, supervivencia y acrosomía espermática del semen descongelado de morueco. *An Fac Vet León* 1985; 31: 233-43.
2. Fattouh ESM, Abdou MSS. Effect of caffeine on the post-thaw motility of buffalo spermatozoa. *Theriogenology* 1991; 36: 149-54.
3. Gradil CM, Bail BA. The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology* 2000; 54: 1041-7.
4. Sinha MP, Sinha AK, Singh BK. Effect of methylxanthines on motility and fertility of frozen-thawed goat semen. *Theriogenology* 1995; 44: 907-14.
5. Watson PF. Artificial insemination and the preservation of semen. En: GE Lamming (ed.). *Marshall's physiology of reproduction*. 4th edition. Vol. 2: *Reproduction in the male*. Churchill Livingstone; 1990. p. 747-869.
6. Mixner JP, Saroff J. Interference by glycerol with differential staining of bull spermatozoa. *J Dairy Sci* 1954; 37: 652.
7. Woelders H. Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. *Reprod Dom Anim* 1991; Suppl. 1: 145-64.
8. Baltes TJ. Plasma membrane evaluation with fluorescent stains, and computer-measured motility as indicators of *in vitro* aging of boar spermatozoa. Thesis. *Tierärztliche Hochschule Hannover*; 1993.
9. Pintado B, De la Fuente J, Roldán ERS. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J Reprod Fertil* 2000; 118: 145-52.
10. Tamuli MK, Watson PF. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Anim Reprod Sci* 1994; 35: 247-54.



11. Valcárcel A, De las Heras MA, Pérez L, Moses DF, Baldassarre H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology* 1994; 41: 483-9.
12. Valcárcel A, De las Heras MA, Pérez L, Moses DF, Baldassarre H. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Anim Reprod Sci* 1997; 41: 483-9.
13. Bwanga CO, De Braganca MM, Einarsson S, Rodríguez-Martínez H. Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi-straws. *J Vet Med A* 1990; 37: 651-8.
14. Berger T. Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology* 1990; 33: 689-95.
15. Harrison RAP, Vickers E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1990; 88: 343-52.
16. Carrasco JL. El método estadístico en la investigación médica: Ciencia 3; 1995.
17. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En: E Knobil and JD Neill (eds.). *The physiology of reproduction*. 2nd edition: Raven Press 1994; p. 189-317.
18. Medrano A, Holt WV. Inter-individual boar sperm susceptibility to freezing-thawing protocols. *Arch Zootec* 1998; 47: 319-27.
19. Bailey JL, Buhr MM. Regulation of internal Ca⁺⁺ by chilled bull and boar spermatozoa. *Cryobiology* 1995; 32: 259-69.
20. Watson PF, Plummer JM. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. En: LA Johnson and K Larsson (eds.). *Deep freezing of boar semen: Swedish University of Agricultural Sciences* 1985; p. 113-27.
21. White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fert Dev* 1993; 5: 639-58.
22. Garbers DL, First NL, Gorman SK, Lardy HA. The effects of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors on ejaculated porcine spermatozoan metabolism. *Biol Reprod* 1973; 8: 599-606.
23. Peterson RN, Seyler D, Bundman D, Freund M. The effect of teophylline and dibutyl cyclic AMP on the uptake of radioactive calcium and phosphate ions by boar and human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1979; 55: 385-90.
24. Garbers DL, First NL, Sullivan JJ, Lardy HA. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoan respiration and motility by caffeine. *Biol Reprod* 1971; 5: 336-9.
25. Tash JS, Means AR. Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol Reprod* 1982; 26: 745-63.
26. Rees IM, Ford WCL, Hull MGR. Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1990; 90: 147-56.
27. Paquignon M. Semen technology in the pig. En: M Courrot (ed.) *The male in farm animal reproduction: Martinus Nijhoff Publishers* 1984; p. 202-18.
28. Bussièrre JF, Bertaud G, Guillouet P. Conservation de la semence congelée de verrat. Résultats in vitro et après insémination. *Journées Rech Porcine en France* 2000; 32: 429-32.
29. Bwanga CO, Einarsson S, Rodríguez-Martínez H. Deep freezing of boar semen packaged in plastic bags and straws. *Reprod Dom Anim* 1991; 26: 117-25.
30. Bwanga CO, Einarsson S, Rodríguez-Martínez H. Cryopreservation of boar semen. II: effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini- and maxi-straws and plastic bags. *Acta Vet. Scand* 1991; 32: 455-61.
31. Eriksson BM, Rodríguez-Martínez H. Deep-freezing of boar semen in plastic film "cochettes". *J Vet Med A* 2000; 47: 89-97.
32. Ashizawa K, Katayama S. Maintenance of motility of fowl spermatozoa in vitro is prolonged by a low molecular weight factor derived from cultured chick embryo cells. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 685-91.