



Universitat de Girona

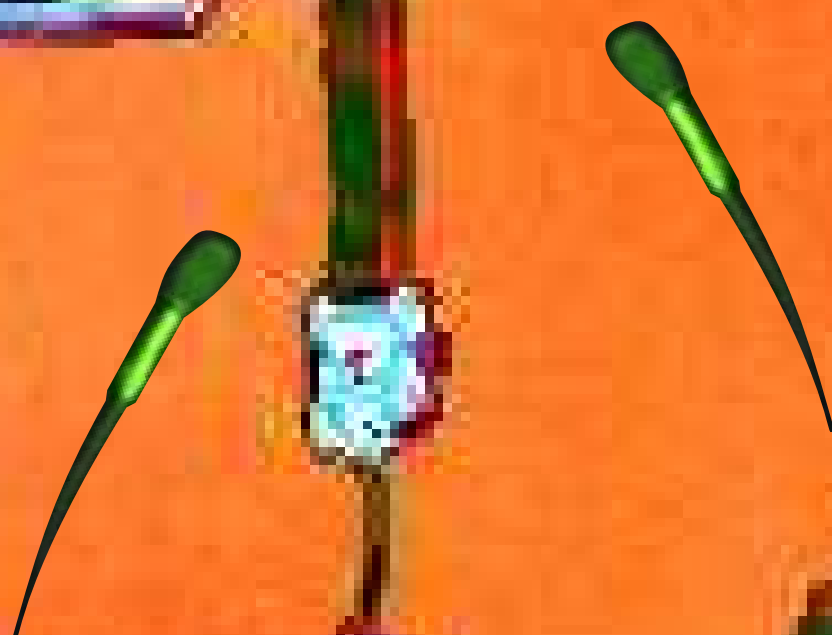
**MILLORA DE LA QUALITAT ESPERMÀTICA DE
DOSIS SEMINALS DE MASCLES
REPRODUCTORS PIÉTRAIN PER FILTRACIÓ
EN DIVERSES REÏNES**

Eva BUSSALLEU MUNTADA

ISBN: 978-84-691-3876-2

Dipòsit legal: GI-561-2008

**MILLORA DE LA QUALITAT
ESPERMÀTICA DE DÒSIS SEMINALS
DE MASCLES REPRODUCTORS
PIÉTRAIN PER FILTRACIÓ EN
DIVERSES REINES**



**EVA BUSSALLEU MUNTADA
TESI DOCTORAL
UNIVERSITAT DE GIRONA
2008**



**MILLORA DE LA QUALITAT ESPERMÀTICA
DE DOSIS SEMINALS DE MASCLES
REPRODUCTORS PIÉTRAIN PER FILTRACIÓ
EN DIVERSES REÏNES**

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de
Girona, per:

Eva Bussalleu Muntada

Vist-i-plau dels directors,

Dr. Sergi Bonet Marull
Àrea de Biologia Cel·lular
Universitat de Girona

Dra. Elisabet Pinart Nadal
Àrea de Biologia Cel·lular
Universitat de Girona

Girona, 2008

Als meus pares,
als meus avis

AGRAÏMENTS

Per fi ja he arribat a un dels ports en la meua travessia cap a Ítaca. En aquesta estació, després del camí començat fa uns anys, la tesi ja és una realitat! Durant aquest sender, igual que en el camí de la vida, hi ha hagut moments bons i altres no tant, però que m'han servit per créixer i aprendre. Però aquest camí no hauria estat possible sense l'ajut i la confiança de moltes persones....

Així doncs, en primer lloc vull manifestar el meu agraïment al Dr. Sergi Bonet per la seva confiança i per haver-me donat l'oportunitat de treballar en el grup i d'haver realitzat aquesta tesi. A la Beth, per les correccions, la paciència i els consells; per l'ajuda i els ànims durant tota la realització del treball i també per la confiança. Gràcies Beth!

També a la Mailo, la Sílvia, l'Anna P., en Marc, l'Isa, l'Anna F., l'Elena, la Judit i la Marta per les hores compartides dins i fora de la feina, per les llargues converses personals i professionals, pels consells en tots els àmbits, que m'han servit de molt dins i fora de la feina; i sobretot gràcies per la paciència, els ànims i la gran ajuda que sempre m'heu donat i per l'amistat!

A la Cesca per l'ajuda tècnica prestada en tot moment i també pels ànims.

A la gent d'espais comuns i voltants: Marçal, Olga, Sílvia, Montse, Olaya, Gela, Àlex nen, Àlex nena, Mireia, Núria, Anna, Jess, Pere, Ariadna, Marta, Marc, Gerard.... Gràcies per les estones compartides a la uni i també en els sopars, festes, etc...

També donar les gràcies a la gent de l'Institut d'Agrobiotecnologia - Agrobioteknologiako Institutua d'Iruña, especialment a la Ido per les estones compartides dins i fora del *laborategia!* I a la gent del pis d'Iruña, la María i en Simon, perquè vaig trobar en ells dos grans amics! Gràcies a tots per haver fet de la meua estada a Iruña una experiència molt feliç i enriquidora!

A la gent de laboratori de Reproducció Animal de la UAB per la realització d'algunes proves que m'han servit per completar aquest treball.

Vull agrair especialment el suport dels meus pares; sense vosaltres, la vostra ajuda, paciència i comprensió, i sobretot sense el vostre amor, mai hauria pogut fer aquesta tesi ni moltes altres coses. Gràcies per ser sempre al meu costat, aguantar els meus estirabots i haver-me animat sempre a tirar endavant i no deixar de lluitar. I també gràcies als meus avis, que encara que no hi són, sempre hi seran.

De tot cor, moltes gràcies a les *voletes i voletes peludes*, l'Alba, en Toni, l'Anna B., en Jorge, l'Anna N., en Jordi C. i el petit Arnau, el primer membre de la segona generació *voleta*; l'Elena, en Carlos, la Gemma M., en Jordi B., la Gemma P., en Rabi, la Jèssica, en Roger, la Núria, l'Ivan, la Laura, en César, l'Albert, en Jordi Casacuberta, en Marc, en Dani, la Sílvia, l'Anna Pi, l'Ester, en Quim i en Fes. Amb tots i cadascun de vosaltres he viscut moltes experiències i moments inoblidables que m'han servit per créixer i per ser feliç, per riure, per plorar, per viure! De tot el que he viscut amb cada un de vosaltres per separat o junts en podria escriure una altra tesi! Resumint, però, us vull agrair les nits i dies de somnis i aventures compartits, els concerts, els dinars, els sopars, les ratafies, les converses de tot i de res, les festes, les excursions, les acampades, les escalades, la poesia, la màgia, els somriures, les abraçades, els petons, etc... Pels ànims i confiança quan he defallit, per fer-me riure, simplement, gràcies per ser sempre al meu costat. Us estimo molt!

A "*lu món de la Pi, lu món de la més ben parí*" per la portada *porqueta*! Gràcies Pibe! I a l'Ester per la contraportada *des del cor*! Gràcies "bruixeta"!

A la Cati i la Glòria, per les aventures viscudes, les corrandes ballades i la seva amistat. Per haver-me animat sempre i haver compartit aventures indescriptibles! I a en Bacu per haver-me fet riure i passar vergonya aliena més d'una vegada...

A l'Esther, gràcies pels cafès, les converses, els ànims i ser sempre al meu costat. Gràcies per haver estat un gran puntal que m'ha aixecat quan creia que ja no podia, per haver-me aguantat tantes llàgrimes i fer-me esbotzar somriures! Gràcies per no deixar que les fades m'abandonin!

A les meves *nenes*, les meves *cosinetes*, la Jèssica, l'Ester i la Sílvia i al meu *cosinet*, en Xevi. Gràcies per haver-me fet riure, per les caminades pel bosc, les excursions amb bici, per tots aquests anys d'haver-nos fet grans junts i per tot el que hem compartit a can Pujató i fora d'allí.

A tots aquells i aquelles (ja siguin humans o animallets ☺) que m'he trobat durant aquest magnífic i misteriós camí que és la vida i que d'una manera o altra m'han ajudat a viure-la més intensament o simplement a viure-la. Als somnis, per seguir lluitant per ells perquè un dia es converteixin en realitat!

Finalment, disculpeu-me si em deixo algú i si és així, accepteu el meu agraïment. Pau, salut i revolució!

De tot cor, **MOLTES GRÀCIES!**

..... *Els moments*.....

A vegades, pels camins de la vida, una mirada, un somriure, un mot, una frase, un fragment de cançó penetren en tu, t'impacten i et fan pensar. O simplement, no cal buscar-hi, tants significats, t'agraden.

"Ningú no pot fer sentir-te lliure, ho has de fer tu mateix/a"

Inadaptats - *Cançons lliures*

"Todos soñamos con ser un caballero y tener algo por lo que luchar y un amor que defender. Si tienes un ideal, un principio, defiéndelo y aférrate a él, alguien escribió que la vida es sueño y los sueños, sueños son. Sé rebelde cómo el mar y sé noble porque al final de esta vida llevarás tu libertad. No importa cuán loco/a te crean todos. Manténte firme, manténte en pie, buscar tu sitio encontrarte a ti mismo, es tu misión, es la razón"

Mago de Öz - *Ancha es Castilla*

"Ser arquitecte i paleta de tu mateix, saber-se lliure quan davant tens una reixa i créixer quan la vida et dóna un cop i tornar a néixer quan ja et donen per mort. Fades acorralades que es veuen tancades, sortiu armades de somnis i riallades, estimeu-vos i valoreu allò que sou i feu".

Pirat's Sound Sistema - *Complicitats*

"Cada fada morta és un infant que no hi creu, la civilització les va matant; tu segueix cantant..."

L'últim crit ha deixat anar tota la passió, queda l'esperança si encara es creu amb la il·lusió..."

Cesk Freixas - *L'última fada*

"A voltes ets la dida, i a voltes la destrat, que veu tots els envits, d'aquesta aposta, sense que ningú et dicte com és com has de viure."

Feliu Ventura- *Com la pell de la bresquilla*

"Quan surts per fer el viatge cap Ítaca, has de pregar que el camí sigui llarg, ple d'aventures, ple de coneixences. Tingues al cap la idea d'Ítaca. Has d'arribar-hi, és el teu destí, però no forçis gens la travessia. És preferible que duri molts anys, que siguis vell quan fondegis l'illa, ric del tot el que hauràs guanyat fent el camí sense esperar que et doni més riqueses".

Konstandinos Kavafis (Traducció de Carles Riba i adaptació de Lluís Llach".

"La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, se aleja dos pasos y el horizontes se corre diez pasos más allá. ¿Entonces para qué sirve la utopía? Para eso, para caminar".

Eduardo Galeano.

I les paraules.....

Pau... Amor... Amistat... i que mai falti el somriure!

ÍNDEX

RESUM/RESUMEN/SUMMARY

OBJECTIUS17

1. INTRODUCCIÓ.....20

1.1. La raça Piétrain.....20

1.2. L'espermatozoide.....20

1.3. La múltiple tinció fluorocròmica : parts a marcar.....22

1.3.1. El nucli.....23

1.3.2. L'acrosoma.....23

1.3.3. La beina mitocondrial.....24

1.4. Mètodes de millora de la qualitat espermàtica.....25

1.5. Filtració d'espermatozoides en columnes de Sephadex, llana de vidre i glass beads.....26

1.6. Tipus de reïnes emprades en els mètodes de gel filtració.....27

1.6.1. El Sephadex neutre i iònic.....27

1.6.2. Els glass beads i la llana de vidre.....30

2. MATERIAL I MÈTODES.....33

2.1. Material.....33

2.1.1. Característiques dels exemplars i obtenció de les mostres.....33

2.1.2. Característiques de les diferents reïnes.....33

2.1.3. Característiques dels diferents fluorocroms.....34

2.2. Mètodes.....34

2.2.1. Desenvolupament d'un protocol de múltiple marcatge amb fluorocroms.....34

2.2.2. Determinació de les condicions òptimes de filtració en diferents columnes.....35

2.2.3. Anàlisi de la qualitat espermàtica.....36

2.2.3.1. Concentració, motilitat i morfologia espermàtiques.....36

2.2.3.2. Vitalitat espermàtica.....38

a) Vitalitat espermàtica amb eosina nigrosina.....38

b) Vitalitat espermàtica amb múltiple marcatge amb fluorocroms.....38

2.2.3.3. Test de resistència hipoosmòtica (ORT).....39

2.2.3.4. Test HRT.....	40
2.2.3.5. Determinació de la formació de L-lactat.....	41
2.2.4. Filtració de dosis seminals en columnes.....	41
2.2.4.1. Muntatge de les columnes.....	42
a) Rehidratació del Sephadex (neutre i iònic) i empaquetat de les columnes...	42
b) Preparat i empaquetat de les columnes de glass beads.....	42
c) Preparat i empaquetat de les columnes de llana de vidre.....	43
2.2.4.2. Filtració de les dosis seminals i regulació del flux.....	44
2.2.4.3. Recollida de les alíquotes filtrades.....	44
2.2.4. Anàlisi estadística.....	45
3. RESULTATS.....	46
<u>Article 1</u> : Development of a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa. <i>Micros Res Tech</i> , 68(5), 277-83 (2005).....	48
<u>Article 2</u> : Effects of filtration of semen doses from subfertile boars through neuter Sephadex columns. <i>Reprod Dom Anim</i> 43, 48-52 (2008).....	55
<u>Article 3</u> : Improvement of sperm quality of boars affected by various pathologies using four different matrixes (enviat i en revisió).....	61
4. DISCUSSIÓ GENERAL.....	87
5. CONCLUSIONS.....	95
6. BIBLIOGRAFIA.....	98

RESUM

L'anàlisi de la qualitat espermàtica és essencial a fi de determinar si les dosis seminals produïdes per un mascle poden ser utilitzades en la inseminació artificial (IA). Tradicionalment, aquestes anàlisis es basen en la valoració de la motilitat, la morfologia, la vitalitat i la concentració espermàtiques al microscopi òptic. De totes maneres, en els darrers anys s'han desenvolupat tècniques de múltiple marcatge amb fluorocroms, les quals permeten valorar l'estat funcional i la vitalitat de l'espermatozoide a partir de l'avaluació conjunta i simultània de la integritat de la beina mitocondrial, de la membrana plasmàtica, de l'acrosoma i del DNA. En aquest treball s'ha dissenyat un mètode ràpid i fiable de tinció amb fluorocroms per a l'anàlisi de la integritat i vitalitat espermàtiques a partir del marcatge de la beina mitocondrial amb MitoTracker®Green FM, de l'acrosoma amb la lectina *Trypsin inhibitor* from Soybean (SBTI) conjugada amb el fluorocrom Alexa Fluor®488 específic per la proacrosina i del nucli amb els fluorocroms bis-benzamida (específic per a cèl·lules viables) i iodur de propidi (específic per a cèl·lules no viables).

Mitjançant aquesta tècnica s'obté una estimació dels espermatozoides amb la membrana plasmàtica, el nucli, la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes, i per tant, potencialment fèrtils. A més aquesta anàlisi està altament correlacionada amb els valors de motilitat i morfologia obtinguts emprant el programa informàtic SCA®Producció 2002, i és equivalent als valors de vitalitat espermàtica obtinguts amb la tinció eosina-nigrosina.

En aquest treball, a més del disseny del múltiple marcatge amb fluorocroms, també s'ha estudiat l'efecte de la filtració sobre la qualitat espermàtica de dosis seminals de mascles subfèrtils en diferents reïnes. La qualitat espermàtica de les dosis abans i després de la filtració s'ha valorat a partir de l'anàlisi de la vitalitat espermàtica emprant la tècnica de múltiple marcatge, de l'anàlisi de la motilitat, morfologia i concentració espermàtiques mitjançant el programa informàtic SCA®Producció 2002; de la resistència osmòtica, a partir dels tests ORT i HRT, i de l'activitat metabòlica a partir de la producció de L-lactat.

La filtració de dosis seminals refrigerades de mascles astenoteratospèrmics en columnes de Sephadex G-25 Medium, Sephadex G-50 Fine, Sephadex G-50 Medium i Sephadex G-75 (amb una alçada de reïna de 10 ± 0.5 cm i un flux de sortida 1ml/20 segons i una Tª de treball 23°C en tots els casos) provoca un augment de la freqüència d'espermatozoides madurs i d'espermatozoides viables. La filtració també comporta una disminució de la resistència hipoosmòtica, però no de resistència hiperosmòtica dels espermatozoides, i de la motilitat espermàtica. Aquest descens de la motilitat es considera, però, transitori, ja que l'activitat

metabòlica i la integritat de la beina mitocondrial dels espermatozoides es mantenen sense canvis després de la filtració. Tot i la millora de la qualitat espermàtica, la filtració provoca un descens significatiu de la concentració espermàtica.

La filtració de dosis seminals refrigerades de mascles reproductors Piétrain afectats d'astenspèrmia, astenoteratospèrmia i teratospèrmia en columnes de Sephadex DEAE-50 (2.5 ± 0.5 cm), Sephadex CM-50 (5 ± 0.5 cm), llana de vidre (2 ± 0.5 cm) i glass beads (10 ± 0.5 cm), amb un flux de sortida d'1ml/40 segons i 23°C de temperatura per a totes les columnes provoca un augment significatiu de la freqüència d'espermatozoides madurs, sense afectar la freqüència d'espermatozoides mòbils i viables, ni l'activitat metabòlica ni la resistència hiperosmòtica, però disminuint significativament la resistència hipoosmòtica dels espermatozoides. La filtració no comporta canvis en la concentració espermàtica.

En conclusió, les condicions establertes per a la filtració en columnes de Sephadex neutre de dosis seminals refrigerades procedents de mascles porcins astenoteratonecrospermics permeten millorar la vitalitat i morfologia espermàtiques de dosis seminals amb una elevada concentració espermàtica, per bé que caldria reajustar les condicions de filtració, és a dir, modificar l'alçada de la reïna i/o el flux de sortida, per evitar la pèrdua significativa d'espermatozoides. En canvi, les condicions de filtració establertes per les columnes de Sephadex iònic, llana de vidre i glass beads són les adequades per a millorar la morfologia espermàtica de dosis seminals refrigerades procedents de mascles porcins subfèrtils destinades a IA.

RESUMEN

El análisis de la calidad espermática es esencial para determinar si las dosis seminales de un macho pueden ser utilizadas para inseminación artificial (IA). Tradicionalmente, estos análisis se basan en la valoración de la motilidad, la morfología, la vitalidad y la concentración espermáticas al microscopio óptico. De todos modos, en los últimos años se han desarrollado técnicas de múltiple marcaje con fluorocromos, las cuales permiten valorar el estado funcional y la vitalidad del espermatozoide a partir de la evaluación conjunta y simultánea de la integridad de la vaina mitocondrial, la membrana plasmática, el acrosoma y el DNA. En este trabajo se ha desarrollado un método rápido y fiable de tinción con fluorocromos para el análisis de la integridad y vitalidad espermáticas a partir del marcaje de la vaina mitocondrial con MitoTracker®Green FM, del acrosoma con la lectina Trypsin inhibitor from Soybean (SBTI) conjugada con el fluorocromo Alexa Fluor®488 específico para la proacrosina y del núcleo con los fluorocromos bis-benzamida (específico para células viables) y yoduro de propidio (específico para células no viables).

Mediante esta técnica se obtiene una estimación de la frecuencia de lospermatozoides con la membrana plasmática, el núcleo, la vaina mitocondrial y el acrosoma intactos, y por lo tanto, potencialmente fértiles. Además dicho análisis está altamente correlacionado con los valores de motilidad y morfología obtenidos empleando el programa informático SCA®Producció 2002, y es equivalente a los valores de vitalidad espermática obtenidos mediante la tinción eosina-nigrosina. En este trabajo, además del diseño del múltiple marcaje con fluorocromos, también se ha estudiado el efecto de la filtración sobre la calidad espermática de dosis seminales de machos subfértiles en diferentes matrices. La calidad espermática de las dosis antes y después de la filtración se ha valorado a partir del análisis de la vitalidad espermática empleando la técnica de múltiple marcaje, el análisis de la motilidad, morfología y concentración espermáticas mediante el programa informático SCA®Producció 2002; la resistencia osmótica a partir de los tests ORT y HRT, y la actividad metabólica a partir de la producción de L-lactato.

La filtración de dosis seminales refrigeradas de machos astenoteratospérmicos en columnas de Sephadex G-25 Medium, Sephadex G-50 Fine, Sephadex G-50 Medium y Sephadex G-75 (con una altura de matriz de 10 ± 0.5 cm y un flujo de salida 1ml/20 segundos y una Tª de trabajo 23°C en todos los casos) provoca un aumento de la frecuencia de espermatozoides maduros y de espermatozoides viables. La filtración también conlleva una disminución de la resistencia hiposmótica, pero no de la resistencia hiperosmótica de los espermatozoides, y de la motilidad espermática. De todas formas, este descenso de la motilidad se considera, transitorio, puesto que la actividad metabólica y la integridad de la vaina mitocondrial de los espermatozoides se

mantienen sin cambios tras la filtración. A pesar de la mejora de la calidad espermática, la filtración provoca un descenso significativo de la concentración espermática.

La filtración de dosis seminales refrigeradas de machos reproductores Piétrain afectados de astenospermia, astenoteratospermia y teratospermia en columnas de Sephadex DEAE-50 (2.5 ± 0.5 cm), Sephadex CM-50 (5 ± 0.5 cm), lana de vidrio (2 ± 0.5 cm) y glass beads (10 ± 0.5 cm), con un flujo de salida de 1ml/40 segundos y 23°C de temperatura para todas las columnas provoca un aumento significativo de la frecuencia de espermatozoides maduros, sin afectar la frecuencia de espermatozoides móviles y viables, ni la actividad metabólica ni la resistencia hiperosmótica, aunque disminuye de forma significativa la resistencia hipoosmótica de los espermatozoides. La filtración no provoca cambios en la concentración espermática.

En conclusión, las condiciones establecidas para la filtración en columnas de Sephadex neutro de dosis seminales refrigeradas procedentes de machos porcinos astenoteratonecrospermicos permiten mejorar la vitalidad y morfología espermáticas de dosis seminales con una elevada concentración espermática, aunque sería necesario reajustar las condiciones de filtración, es decir, modificar la altura de la matriz y/o el flujo de salida, para evitar la pérdida significativa de espermatozoides. Contrariamente, las condiciones de filtración establecidas para las columnas de Sephadex iónico, lana de vidrio y glass beads son las adecuadas para mejorar la morfología espermática de dosis seminales refrigeradas procedentes de machos porcinos subfértiles destinadas a IA.

SUMMARY

The analysis of sperm quality is essential to determine whether seminal doses can be used for artificial insemination (AI). Traditionally, these analyses are based on the valuation of sperm motility, morphology, vitality and concentration by light microscopy. Anyway, in recent years, multistaining techniques with fluorochromes have been developed to evaluate the functional status and vitality of spermatozoa from the simultaneous assessment of the integrity of the mitochondrial sheath, the plasmatic membrane, the acrosome and the DNA. In this work, a quick and reliable method of staining with fluorochromes was designed for the assessment of the sperm integrity and vitality by marking the mitochondrial sheath with MitoTracker®Green FM, the acrosome with the lectine Trypsin inhibitor from Soybean (SBTI) fluorochrome conjugated with the fluorochrome Alexa Fluor® 488 specific for the proacrosine and, the nucleus with the fluorochromes bis-benzamida (specific for viable cells) and propidium iodide (specific for non-viable cells).

This technique gave an estimation of the frequency of spermatozoa with intact plasma membrane, nucleus, mitochondrial sheath and acrosome, and consequently, of the frequency of potentially fertile spermatozoa. This analysis was also highly correlated with the values of motility and morphology obtained using the software SCA®Producció 2002, and it was equivalent to sperm vitality values obtained using the eosin-nigrosin staining.

Apart from designing a fluorochrome multistaining method, in this study, the effect of filtration in different matrixes on the sperm quality of seminal doses from subfertile boars was also evaluated. The sperm quality of seminal doses before and after filtration was evaluated from the analysis of the sperm vitality using the fluorochrome multiplestaining technique, the analysis of the sperm motility, the sperm morphology and the sperm concentration with the software SCA®Producció 2002, the osmotic resistance, with ORT and HRT tests, and the metabolic activity from the production of L-lactate.

The filtration of seminal doses from asthenoteratospermic males in columns of Sephadex G-25 Medium, Sephadex G-50 Fine, Sephadex G-50 Medium and Sephadex G-75 (with a height of matrix of 10 ± 0.5 cm and a flow rate of 1ml/20 seconds and a working temperature of 23°C in all cases) resulted in an increase in the frequency of mature and viable spermatozoa. Filtration also caused a decrease in the hypoosmotic resistance but not the hypertonic resistance of the spermatozoa, or the sperm motility. Nevertheless, the decrease in sperm motility values was considered transitory, because the metabolic activity and the integrity of the mitochondrial sheath of spermatozoa remained unchanged after filtration. Despite the improvement in the sperm quality, filtration led to a significant drop in sperm concentration.

Filtration of seminal doses from Piétrain boars affected by asthenospermia, asthenoteratospermia and teratospermia in columns of Sephadex DEAE-50 (2.5 ± 0.5 cm), Sephadex CM- 50 (5 ± 0.5 cm), glass wool (2 ± 0.5 cm) and glass beads (10 ± 0.5 cm), with an outflow of 1ml/40 seconds and 23 °C of working temperature for all columns produced a significant increase in the frequency of mature spermatozoa without affecting the frequency of motile and viable spermatozoa, or metabolic activity or hypertonic resistance. In contrast the resistance of spermatozoa to hypotonic media decreased significantly. Filtration did not involve changes in the spermiatic concentration.

In conclusion, the conditions settled for the filtration of refrigerated doses from asthenoteratospermic Piétrain boars in neutral Sephadex allowed the improvement of the sperm vitality and morphology, a readjustment of filtration conditions like changing the height of the matrix and/or the exit flow rate, is necessary in order to avoid significant sperm loss. Instead, the conditions set for filtration in Sephadex ionic, glass wool and glass beads columns are appropriate to enhance the sperm morphology from refrigerated seminal doses from subfertile boars used for IA.

Objectius

OBJECTIUS

Els mètodes convencionals d'anàlisi de la qualitat espermàtica dels ejaculats es basen en la valoració/determinació de la motilitat espermàtica (percentatge d'espermatozoides mòbils), la morfologia espermàtica (% d'espermatozoides madurs, immadurs i aberrants) i la vitalitat espermàtica (% d'espermatozoides vius) (González-Urdiales i col., 2006). Cadascun d'aquests paràmetres s'analitza per separat al microscopi òptic, de manera que sovint proporcionen un diagnòstic poc fiable de la fertilitat dels mascles (Fraser i col., 2001; Ducci i col., 2002). En els darrers anys s'han desenvolupat tècniques de tinció multicolors que permeten valorar la capacitat fecundant dels espermatozoides a partir de l'anàlisi conjunta de la integritat de l'acrosoma, de la beina mitocondrial, del DNA i de la membrana plasmàtica (Juonala i col., 1999; Langois i col., 2005; Januskauskas i col., 2005). Els espermatozoides marcats amb fluorocroms es poden analitzar al microscopi òptic de fluorescència (Pinart i col., 2006) o per citometria de flux (Peña i Rodríguez., 2006).

Així doncs, el **primer objectiu** d'aquest estudi és la posada a punt d'un mètode de múltiple marcatge amb fluorocroms per a l'anàlisi conjunta de la viabilitat i de l'estat funcional dels espermatozoides, a partir de la tinció específica del nucli, l'acrosoma i la beina mitocondrial.

Actualment, la demanda de dosis seminals de mascles reproductors porcins de la raça Piétrain està augmentant considerablement, la qual cosa provoca una major presència d'aquests mascles als centres d'Inseminació Artificial (IA) del nostre país. Quan aquests mascles reproductors arriben als CIAs proporcionen ejaculats d'elevada qualitat espermàtica, però després d'uns mesos de confinament s'observa un increment de la freqüència d'espermatozoides aberrants. El descens de la qualitat espermàtica dels ejaculats provoca una disminució del rendiment reproductiu d'aquests mascles, i conseqüentment, importants pèrdues econòmiques als CIAs.

Existeixen diferents protocols de millora de la qualitat espermàtica de mascles subfèrtils que s'han demostrat eficaços, entre els que destaquen la filtració en columnes, millora la motilitat espermàtica, la vitalitat espermàtica i la morfologia espermàtica de les dosis seminals (Byrd i col., 1994; Claassens i col., 1996; Johnson i col., 1996; Centola i col., 1998; Adiga i Kumar, 2001), per bé que els seus efectes varien considerablement entre espècies i en funció del tipus de reïna emprada. A més dins d'una mateixa espècie els resultats obtinguts pels diferents autors són sovint contradictoris (Januskauskas i col., 2005).

En toros, la filtració d'espermatozoides en columnes de Sephadex neutre de diferent porositat permet incrementar el percentatge d'espermatozoides viables i mòbils i disminuir el percentatge

d'espermatozoides aberrants de les dosis seminals fresques i congelades (Vyas i col., 1992). El **segon objectiu** d'aquest treball és determinar l'efecte de la filtració de dosis seminals de mascles porcins astenoteratospèrmics en columnes de Sephadex neutre de diferent porositat (Sephadex G-25 Medium, Sephadex G-50 Fine, Sephadex G-50 Medium i Sephadex G-75).

Malgrat que les matrius de Sephadex neutre són les més freqüentment emprades, existeixen altres reïnes inertes, com les glass beads, o gairebé inertes, com la llana de vidre, i reïnes d'intercanvi iònic, que permeten millorar un o varis paràmetres espermatícs. Així les matrius de llana de vidre en toros (Kanakaraj i col., 1992) i les matrius de glass beads en equins (Klinc i col., 2005) milloren globalment la qualitat espermatíca, mentre que les matrius d'intercanvi iònic són especialment útils per a la selecció d'espermatozoides viables, ja que els espermatozoides morts o no viables, amb una càrrega superficial alterada, queden adherits a la seva superfície (Anzar i Graham, 1993). El **tercer objectiu** d'aquest treball és determinar l'efecte de les matrius de Sephadex DEAE-50, Sephadex CM-50, llana de vidre i glass beads sobre la qualitat espermatíca de dosis seminals obtingudes a partir de mascles reproductors Piétrain per diferents patologies espermatiques: astenospèrmia, astenoteratospèrmia i teratospèrmia.

Introducció

1. INTRODUCCIÓ

1.1. LA RAÇA PIÉTRAIN

El nom de la raça Piétrain coincideix amb el d'un poble situat a la província belga de Brabante. Existeixen diverses teories factibles sobre l'origen d'aquesta raça; podria haver aparegut com a resultat de l'encreuament entre porcs de la raça Berkshire, porcs de la raça Yorkshire i races autòctones belgues; del creuament de porcs Berkshire amb porcs ibèrics; del creuament de porcs Berkshire amb porcs salvatges de Brabante; o del creuament de porcs de Bayeux (importats durant la I Guerra Mundial des de Normandia) amb porcs belgues autòctons. Alguns creuen que la raça Piétrain es va originar com a resultat d'una mutació.

Morfològicament els porcs Piétrain tenen una aparença curta i arrodonida (Fig. 1); el pes de les femelles adultes oscil·la entre 240-260 Kg i el dels mascles entre 280-300 Kg i la longitud corporal no sol sobrepassar 1.50-1.55 m. Es caracteritzen per presentar una forta musculatura al terç posterior (i també a l'anterior), una capa blanca amb taques negres i/o vermelles i un cap de perfil recte o subcòncav.

L'interès productiu d'aquesta raça rau en el fet que la qualitat de la seva canal és excepcional; té un alt percentatge de parts nobles i molt poca grassa, essent el seu rendiment del 72-73%. El percentatge de pernil i llong és de 56-58% i l'espessor de la grassa dorsal de 17-22 mm.

Un factor desfavorable de la raça Piétrain són els baixos índexs reproductius; les camades tendeixen a ser petites, uns 10 garrins nascuts vius, i el nombre de garrins deslletats de només 7-8. A més, les femelles Piétrain, tot i ser dòcils i bones mares, presenten unes mames recollides i produeixen poca llet; és per aquests motius que no s'usen com a femelles reproductores. D'altra banda, tant els mascles com les femelles presenten una desarmonia anatómico-funcional, a causa de la qual la relació cor/cos és molt petita, que fa que la mortalitat sigui més gran que en altres races, principalment per aturades cardíaques. Aquesta alteració determina que en el nostre país, amb una climatologia estressant, la seva cria sigui complexa. L'explotació comercial de la raça Piétrain es basa en la utilització dels mascles com a reproductors per a la inseminació de femelles d'altres races, com ara Hampshire, Duroc o femelles híbrides per a l'obtenció d'animals d'engreix (Buxadé, 1984).



Figura 1. Imatge d'un mascle reproductor de la raça Piétrain.

1.2. L'ESPERMATOZOIDE

L'espermatozoide és un gàmet que en el cas de *Sus domesticus* té una longitud de 45 μm i presenta tres parts: regió cefàlica o cap, peça de connexió o coll i cua (Bonet i col., 2000) (Fig.

2). Les principals característiques de les diferents parts de l'espermatozoide són:

- Regió cefàlica o cap: el cap és oval i pla, essent les seves mides de 7 μm de longitud, 3.7 μm d'amplada màxima i 0.4 μm de gruix i comprèn l'acrosoma i el nucli. L'acrosoma és un orgànul cel·lular situat a la regió cefàlica de l'espermatozoide, que es disposa sobre el nucli i en el qual es distingeixen tres segments: apical, principal i equatorial. La membrana acrosòmica interna es troba en contacte amb el nucli de l'espermatozoide, i l'externa en contacte amb la membrana plasmàtica. L'acrosoma conté substàncies de naturalesa diversa: alguns mucopolisacàrids, proteïnes, lípids, però sobretot conté hidrolases, com ara la hialuronidasa, que trenca les cèl·lules de la granulosa, i l'acrosina, una serin-proteasa que trenca la zona pel·lúcida de l'oòcit en el moment de la fecundació. El nucli està ocupat per cromatina molt condensada.
- Peça de connexió o coll: té forma cònica amb la base més ampla (1.3 μm) en contacte amb el cap i la més estreta (0.6 μm) en contacte amb la peça intermèdia. La seva longitud és de 0.7 μm .
- Cua: té forma filamentosa i cilíndrica. S'hi disposen la peça intermèdia, la peça principal i la peça terminal. La peça intermèdia té una longitud de 9 μm i un diàmetre de 0.7 μm ; conté la beina mitocondrial, un cilindre de mitocondris que envolta el primer terç del flagel i que es disposa en contacte amb el plasmalemma; té com a funció proporcionar energia per al moviment flagel·lar. L'interior de la peça intermèdia és ocupat per l'axonema, fibres denses i grànuls perifèrics. La peça intermèdia queda separada de la peça principal per l'anell de Jensen.

La peça principal té una longitud de 26.2 μm i un diàmetre de 0.4 μm ; s'hi distingeixen l'axonema i la beina fibrosa. La peça terminal té una longitud de 2.2 μm i un diàmetre de 0.2 μm ; està formada únicament per l'axonema i el plasmalemma circumdant.

L'anàlisi de la integritat de cadascuna d'aquestes parts constitueix un bon indicador de la capacitat fecundant dels espermatozoides (Bussalleu i col., 2005; Pinart i col., 2006).

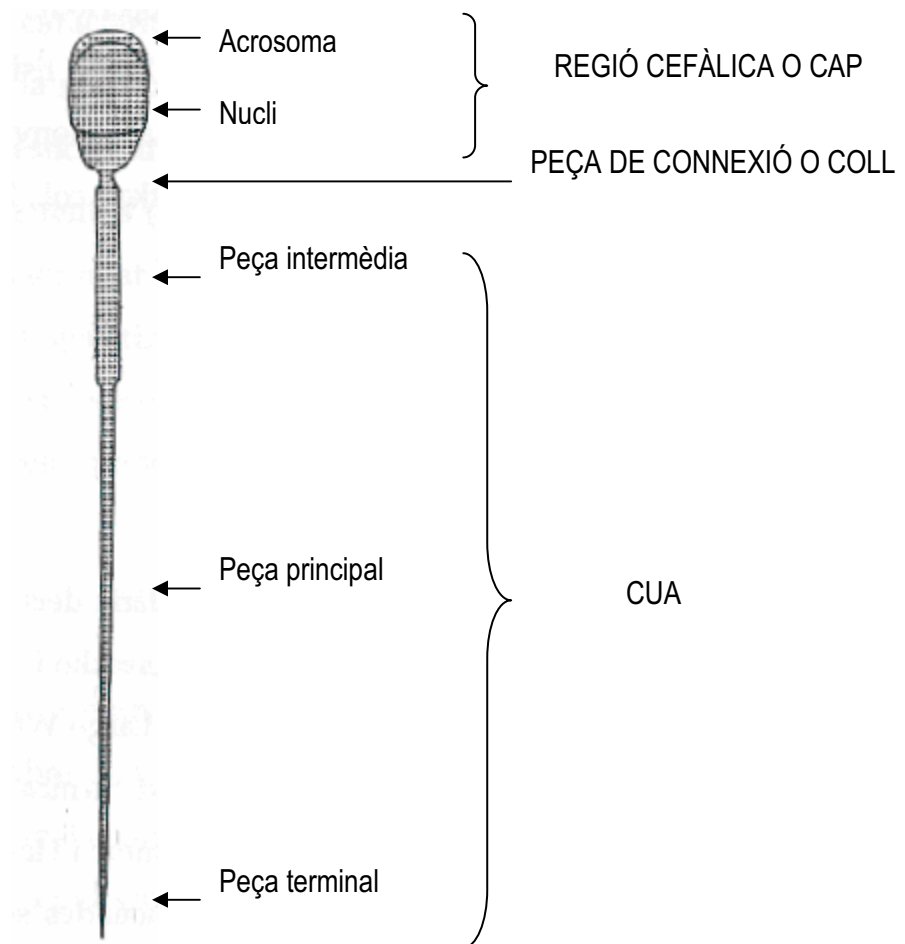


Figura 2. Representació esquemàtica de l'espermatozoide de *Sus domesticus* (Briz, 1994; Bonet i col., 2000)

1.3. LA MÚLTIPLE TINCIÓ FLUOROCRÒMICA: PARTS A MARCAR

L'anàlisi de la qualitat espermàtica dels espermatozoides de porcí s'ha realitzat tradicionalment al microscopi òptic convencional a partir del recompte de la morfologia, la motilitat i la vitalitat espermàtiques, però aquest procediment no permet establir cap correlació entre aquests paràmetres. D'altra banda, aquesta valoració és sovint un procés lent, que requereix del recompte d'un elevat nombre d'espermatozoides per tal de reduir l'error estàndard (Woelders, 1990), i subjectiu, que depèn bàsicament de l'experiència del personal tècnic.

En els darrers anys la microscòpia de fluorescència s'ha convertit en un instrument bàsic per a l'avaluació de la viabilitat dels espermatozoides, a partir de la valoració conjunta de l'estat del nucli, l'acrosoma i la beina mitocondrial. Mitjançant aquesta anàlisi és possible correlacionar la vitalitat i la motilitat espermàtiques amb la capacitat fecundant dels espermatozoides (Juonala i col., 1999; Nagy i col., 2003).

1.3.1. El nucli

Tradicionalment, el fluorocrom més freqüentment emprat per al marcatge del nucli dels espermatozoides humans (Hoshi i col., 1996; Zini i col., 2000), bovins (Dobrinski, i col., 1994) i porcins (Pinart i col., 1999) ha estat el taronja d'acridina, el qual s'excita en ser il·luminat amb llum blava de 450-490nm de longitud d'ona. Aquest fluorocrom s'utilitza per a la valoració de l'estat del DNA, ja que emet fluorescència verda si està unit al DNA íntegre dels espermatozoides viables, i fluorescència taronja quan s'uneix al DNA desnaturalitzat dels espermatozoides no viables (Zini i col., 2000); ambdues fluorescències tenen un rang de longitud d'ona molt proper i poden observar-se simultàniament. La utilització del taronja d'acridina presenta l'inconvenient que sovint es produeixen marcatges intermedis o heterogenis que exigeixen una classificació subjectiva dels espermatozoides. D'altra banda, segons Hoshi i col. (1996) el marcatge amb taronja d'acridina no permet establir cap correlació entre vitalitat espermàtica i fertilitat.

Alguns estudis han demostrat que el doble marcatge utilitzant un fluorocrom específic per a cèl·lules viables i un altre fluorocrom específic per a cèl·lules no viables és molt més sensible que el marcatge simple (Merkies i col., 2000; Nagy i col., 2003; Rowland i col., 2003). En aquests dobles marcatges s'usen fluorocroms per a cèl·lules viables que s'uneixen específicament a enzims que són actius únicament en les cèl·lules vives, o que la seva emissió fluorescent depèn del funcionament de les bombes iòniques (Shapiro, 1998); els més utilitzats són SYBR-14 (Gravance i col., 2001; Huo i col., 2002; Love i col., 2003), Hoechst 33342 (Cai i col., 2005; Hallap i col., 2006) i diaminofenilindol (DAPI) (Bassols i col., 2003). Els fluorocroms per a cèl·lules no viables no poden travessar les membranes de les cèl·lules vives, de manera que només tenyeixen les cèl·lules mortes o alterades; el més habitualment emprat és el iodur de propidi (IP) (Love i col., 2003; Nagy i col., 2003; Rowland i col., 2003).

1.3.2. L'acrosoma

El marcatge de l'acrosoma es realitza habitualment mitjançant lectines unides a fluorocroms. En humans s'utilitzen les lectines PSA (*Pisum sativum agglutinin*) i Con A (Concavalina A)

combinades amb el fluorocrom FITC (isotiocianat de fluoresceïna) (Kinger i Rajalakshmi, 1995; Ozaki i col., 2002) o la lectina SBTI (*Trypsin Inhibitor from Soybean*) combinada amb biotina (Arts i col., 1994). En toros, Cheng i col. (1996) usen la combinació PNA-FITC mentre que Farlin i col. (1992) usen PSA-FITC. La combinació PSA-FITC també és usada en cavalls (Farlin i col., 1992; Casey i col. 1993) i la combinació PNA-FITC en porcíns (Fazeli i col., 1997).

Totes aquestes lectines s'uneixen a l'enzim acrosina; en els espermatozoides amb l'acrosoma intacte la intensitat del marcatge és elevada, però en els espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat la intensitat del marcatge disminueix a conseqüència de la pèrdua de molècules d'acrosina (Ozaki i col., 2002). De totes maneres, existeixen diferències entre les lectines segons la seva especificitat per l'acrosina (Tao i col., 1993); així doncs el marcatge amb Con A és de baixa especificitat, cosa que dificulta la detecció d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat (Kinger i Rajalakshmi, 1995), mentre que el marcatge amb SBTI proporciona una elevada sensibilitat i especificitat en la diferenciació entre espermatozoides amb l'acrosoma intacte i espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat (Arts i col., 1994; Tollner i col., 2000).

1.3.3. La beina mitocondrial

Per a la tinció de la beina mitocondrial es poden utilitzar diferents fluorocroms, com la rodamina en humans (Auger i col., 1993; O'Connell i col., 2002), porcíns (Fraser i col., 2001) i bocs (Windsor, 1997), el iodur de 5,5',6,6'-tetracholoro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine (JC-1) en rates (Gravance i col., 2001), porcíns (Huo i col., 2002), cavalls (Gravance i col., 2000; Love i col., 2003) i bovins (Thomas i col., 1998), i el clorometil-X-rosamina (CMX-Ros) en humans (Poot i col., 1996). Tots ells es caracteritzen per ser catiónics i lipofílics, de manera que difonen passivament a través de la membrana plasmàtica i s'acumulen a la matriu mitocondrial, la qual presenta càrrega negativa; l'acumulació de molècules de fluorocrom depèn directament del potencial de membrana del mitocondri (Gilmore i Wilson, 1999). Existeixen diferències importants entre els fluorocroms en la seva especificitat i la seva fotoestabilitat. La rodamina és molt estable, tot i que de baixa especificitat, mentre que el CMX-Ros permet la detecció específica de mitocondris intactes però requereix d'una anàlisi immediata de les mostres després del seu marcatge (Gilmore i Wilson, 1999). El fluorocrom JC-1 travessa de forma selectiva les membranes mitocondrials en la seva forma monomèrica; si el potencial de membrana és baix manté la seva estructura monomèrica i emet fluorescència verda, però si el potencial de membrana és elevat s'agrega i emet fluorescència vermella (Garner i Thomas, 1999); alguns autors dubten de que les formes monomèriques i agregades d'aquest fluorocrom siguin

indicadors fiables de l'estat funcional de la beina mitocondrial, i consideren que es tracta simplement d'una resposta química a un potencial elèctric (Love i col., 2003).

Els millors resultats de marcatge de la beina mitocondrial s'obtenen amb el fluorocrom MitoTracker®Green FM, les molècules del qual difonen a través de la membrana plasmàtica i s'uneixen específicament als lípids de membrana dels mitocondris funcionals (Keij i col., 2000; Fraser i col., 2001), però no són retingudes pels mitocondris amb un potencial de membrana alterat. Els principals avantatges de MitoTracker®Green FM davant altres fluorocroms específics pels mitocondris són la seva especificitat (Sutovsky i col., 1999) i fotoestabilitat (Poot i col., 1996), així com la seva elevada sensibilitat quan s'incorpora en diferents protocols de doble i triple marcatge (Sutovsky i col., 1999). El MitoTracker®Green FM és més específic que la rodamina 123, i a més, té l'avantatge que es pot fixar als mitocondris tan de cèl·lules viables com no viables i que es pot utilitzar en protocols de doble i triple marcatge (Sutovsky i col., 1999).

1.4. MÈTODES DE MILLORA DE LA QUALITAT ESPERMÀTICA

En la indústria ramadera la inseminació artificial (IA) és la tècnica de reproducció assistida més emprada ja que permet un elevat control genètic i una reducció de la transmissió de malalties, i proporciona elevats beneficis econòmics en la cria d'animals destinats al consum humà (Cisale i col., 2001). En espècies destinades a engreix la implantació exitosa de programes d'IA exigeix la utilització de dosis seminals d'elevada qualitat (Vyt i col., 2004a).

Actualment existeixen diversos procediments per a la millora de la qualitat espermàtica dels ejaculats de mascles d'elevat interès genètic però amb baixa qualitat seminal, com els mètodes de centrifugació en gradients de diferent densitat (Percoll/Isoprep o els gradients de BSA), els mètodes de migració espermàtica (swim-up, swim-up modificat, swim-down, centrifugació i resuspensió) i la filtració amb substàncies adhesives (llana de vidre, glass beads, Leucosorb i Sephadex) (Morrell, 2006). Els gradients de BSA incrementen la motilitat espermàtica però no la fertilitat de dosis seminals procedents de mascles porcins i equins (Graham i Graham, 1990); en humans, la tècnica del Percoll separa els espermatozoides en funció del seu gradient de densitat, mentre que la tècnica del swim-up els separa en funció de la seva motilitat (Georgiou i col., 1998). En humans, el swim-up facilita la recuperació d'espermatozoides mòbils i elimina, sobretot, els espermatozoides amb anomalies de cua, mentre que l'aplicació de gradients de Percoll proporcionen dosis seminals amb bona motilitat i baixa proporció d'espermatozoides amb anomalies cefàliques (Le Lannou i Blanchard, 1998; Hammadeh i col., 2001a). Els mètodes basats en la utilització substàncies adhesives eliminen els espermatozoides morts i altres impureses de l'ejaculat (Sieme i col., 2003), de manera que permeten incrementar la freqüència

d'espermatozoides madurs, viables i amb una elevada motilitat de les dosis seminals; de tota manera la seva eficiència varia en funció del procediment i del tipus de substància adhesiva emprada (Byrd i col., 1994; Claassens i col., 1996; Johnson i col., 1996; Centola i col., 1998; Adiga i Kumar, 2001).

1.5. FILTRACIÓ D'ESPERMATOZOIDES EN COLUMNES DE SEPHADEX, LLANA DE VIDRE I GLASS BEADS

A principis dels anys 70, el Dr. Graham de la Universitat de Minnesota va desenvolupar diversos procediments de filtració de l'ejaculat. Mitjançant una columna formada per Sephadex G-15 i una barrera de suport de llana de vidre va filtrar dosis seminals de boví. La fracció eluïda es caracteritzava per presentar una elevada freqüència d'espermatozoides mòbils i funcionals, mentre que la matriu contenia espermatozoides no funcionals adherits. En un principi, Graham va atribuir a les característiques del Sephadex el mèrit de separar els espermatozoides mòbils i funcionals, però en substituir la llana de vidre per altres suports com la llana de cotó o les fibres sintètiques va observar un increment de la freqüència d'espermatozoides immòbils i no viables en les dosis filtrades; per tant, la llana de vidre tenia un paper important en la recuperació dels espermatozoides mòbils i funcionals. Aquests experiments van contribuir a desenvolupar dos tipus de filtració en columna per a la selecció dels espermatozoides funcionals d'un ejaculat: les columnes de Sephadex i les columnes de llana de vidre. El principi de la filtració amb aquestes columnes es basa en què els espermatozoides no viables són més susceptibles d'adherir-se a la matriu de la columna que no pas els espermatozoides mòbils i aparentment funcionals (Jeyendran, 2002).

A partir dels resultats obtinguts per Graham (1970) es van realitzar nombrosos estudis que van permetre demostrar que la filtració a través de columnes de Sephadex neutre en porcí (Fayemi i col., 1979), braus (Graham i Graham, 1990; Cisale i col., 2001; Januskauskas i col., 2005), humans (Drobnis i col., 1991), búfals (Ahmad i col., 2003) i bocs (Valcárcel i col., 1996); de columnes de glass beads en equins (Casey i col., 1993; Klinc i col., 2005), humans (Daya i col., 1987, Lechtzin i col., 1991) i bovins (Cisale i col., 2001; Foote, 2001); de columnes de llana de vidre en humans (Nani i Jeyendran, 2001; Engel i col., 2001) i equins (Casey i col., 1993), i de columnes de Sephadex d'intercanvi iònic en gossos (Mogas i col., 1998), bovins (Anzar i col., 1995 i 1996) i búfals (Ahmad i col., 2003) elimina de forma efectiva els espermatozoides aberrants, els espermatozoides amb baixa motilitat o immòbils i els espermatozoides amb l'acrosoma malmès. En cavalls, la filtració en columnes mixtes de Sephadex G-10 i fibres de llana de vidre millora la fertilitat de les dosis seminals destinades a IA, per bé que en redueix la

concentració espermàtica (Nie i col., 2003). En el semen de gos, en canvi, l'efecte de les reïnes depèn del tipus de llit mecànic que sustenta les columnes de Sephadex (Mogas i col., 1998). En cavalls i braus la filtració de dosis seminals en Sephadex G-15 en presència de llana de vidre, i sense subjecció de polipropilè inert, atrapa els espermatozoides capacitats que han perdut algunes proteïnes externes de la membrana; això ha fet pensar que en aquestes espècies alguns factors com la clusterina modulen la interacció entre els espermatozoides i les reïnes (Samper i col., 1995; Ibrahim i col., 2001). En humans es comercialitzen kits específics, com ara SpermPrep™ (format per Sephadex G-15), que milloren la motilitat espermàtica de pacients afectats d'astenospermia i/o oligospermia (Ohashi i col., 1992).

Des d'un punt de vista productiu l'aplicació de tècniques de filtració de dosis seminals té un gran interès aplicat ja que permet millorar la qualitat espermàtica de dosis seminals que per les seves característiques haurien de ser descartades, i per tant, permet reduir pèrdues econòmiques en els CIAs. Així, per exemple, a Argentina era freqüent descartar els ejaculats de toro amb menys d'un 65% d'espermatozoides amb motilitat progressiva. Fernández i Cisale (1989) van analitzar 87 ejaculats, dels quals 50 haurien d'haver estat descartats pel seu baix índex de motilitat progressiva; la filtració en columnes de Sephadex G-50 va proporcionar uns resultats excel·lents, ja que el 100% dels ejaculats filtrats contenia un 95% d'espermatozoides mòbils, de manera que tots podien ser utilitzats en programes d'IA. Un altre avantatge del mètode de gel-filtració és que no requereix de gran equipament ni massa temps, com tampoc la necessitat de treballar en condicions estèrils (López i col., 1993).

1.6. TIPUS DE REÏNES EMPRADES EN ELS MÈTODES DE GEL FILTRACIÓ

1.6.1. El Sephadex neutre i iònic

El Sephadex és un dextrà inert produït pel bacteri *Leuconostoc mesenteroides* i que s'usa en investigació, especialment en cromatografies de gel-filtració. Aquest dextrà té diverses aplicacions; una de les més conegudes és la de purificar proteïnes. La filtració de proteïnes a través de columnes de Sephadex es dona de la forma següent (Fig. 3): durant la filtració, les proteïnes se separen en funció de la seva mida a mesura que van travessant la matriu, de manera que les proteïnes d'elevat pes molecular són les primeres en eluir-se, ja que no poden entrar a l'interior dels porus que tenen les boletes de Sephadex i passen pels espais entre boletes; les proteïnes de baix pes molecular surten més tard, perquè passen a través dels porus de l'interior de les boletes, fent que el seu trajecte sigui més llarg.

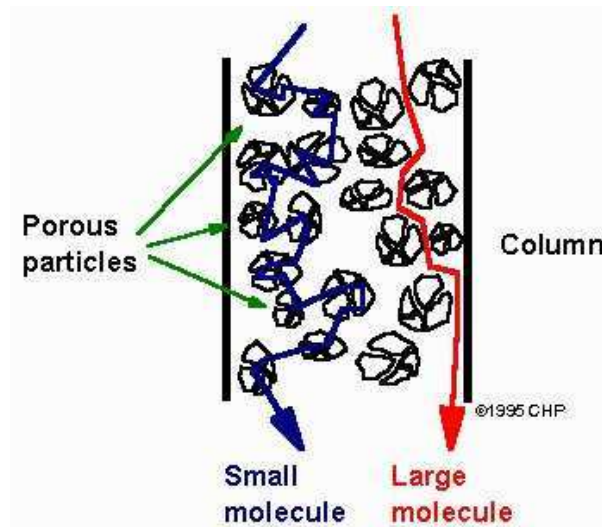


Figura 3. Mecanisme de filtració en columnes de Sephadex.

[www.redpoll.pharmacy.ualberta.ca/493/lect2.ppt]

El fonament de la tècnica de gel filtració de dosis seminals es basa en què els espermatozoides immòbils i les restes cel·lulars queden atrapats en les superfícies rígides de les reïnes, mentre que els espermatozoides mòbils són eluïts gràcies al seu propi moviment i a la força de la gravetat. A més s'ha demostrat que un espermatozoide normal i vigorós és capaç de travessar la barrera de filtració sense modificar les seves característiques funcionals (Anzar i Graham, 1995, 1996).

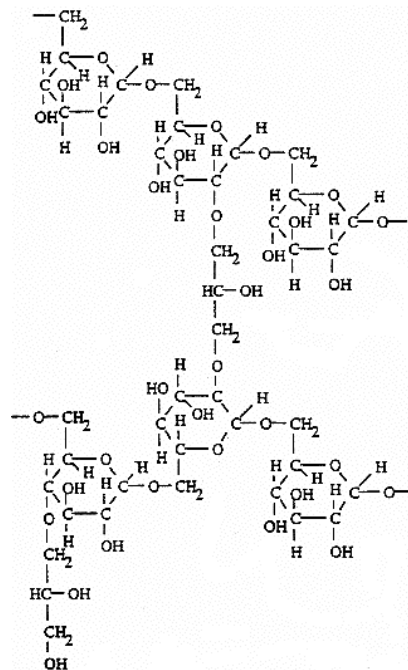


Figura 4. Estructura química del Sephadex.

[<http://ead.univangers.fr/~jaspard/Page2/COURS/6CoursDEUST/CHROMATOGRAPHIE/2FIGURES/2GelFiltration/3SEPHADEX/1GelSephadex.htm>]

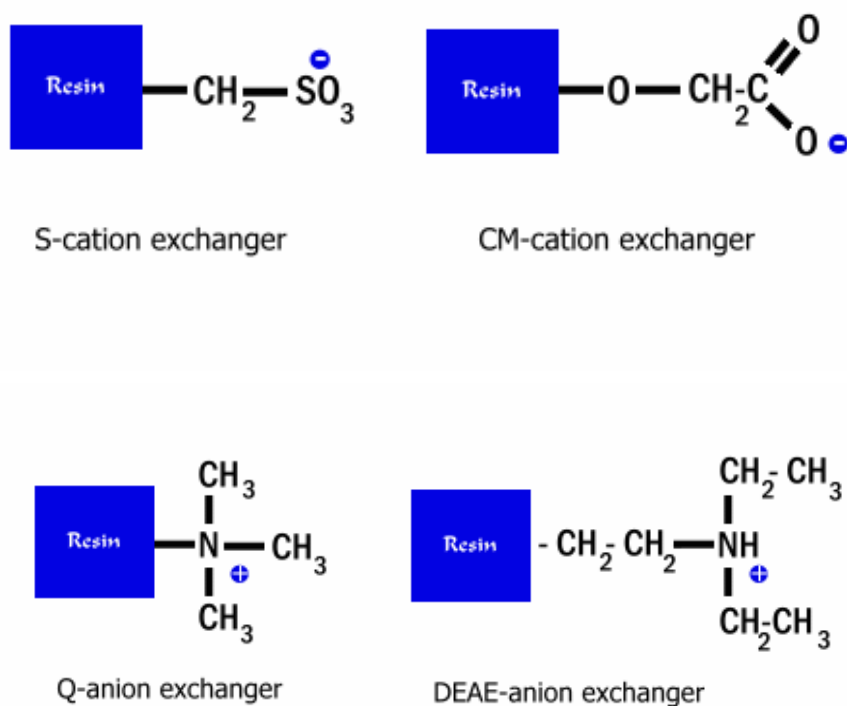


Figura 5. Grups funcionals de les matrius de Sephadex catiònic (CM-Sephadex) i Sephadex aniònic (DEAE-Sephadex). [www.redpoll.pharmacy.ualberta.ca/493/lect2.ppt]

El Sephadex està constituït per unes boletes gelatinoses que s'obtenen a partir de la unió creuada del dextrà amb epicloridrin (Fig. 4). Existeixen diferents tipus de Sephadex neutre, que en conjunt constitueixen la sèrie G, i que difereixen entre si pel grau d'unió i el grau d'inflament en solució aquosa. Així doncs, en el Sephadex G-25 la matriu està més unida que en el Sephadex G-50 o que en el Sephadex G-75, ja que com més petit és el número que segueix la G, més unit està el dextrà i menor és el diàmetre de porus. Dins de la sèrie G, per a cada número hi ha també una altra subclassificació: Coarse, Medium, Fine i Superfine que acota el límit d'exclusió de cada tipus de Sephadex i el valor de permeabilitat.

El Sephadex d'intercanvi iònic es forma a partir de Sephadex neutre de la sèrie G, mitjançant la introducció de grups funcionals, els quals s'uneixen a les unitats de glucosa de la matriu per enllaços estables. Com major és el nombre d'unions creuades, major és la rigidesa de les matrius; així doncs, les matrius formades a partir de Sephadex G-25 tenen més rigidesa que les formades a partir de Sephadex G-50 o G-75, a causa de l'elevat nombre d'unions que es formen. Existeixen molts tipus de Sephadex d'intercanvi iònic però els més emprats en tècniques de gel filtració són el Sephadex DEAE-50 i el Sephadex CM-50 (Taula 1).

El Sephadex DEAE-50 està constituït per una barreja d'intercanviadors aniònics forts, a una proporció 1:2, mentre que el Sephadex CM-50 està format per un únic intercanviador catiònic de caràcter dèbil (Fig.5). Els termes de fort i dèbil es refereixen al grau d'ionització en funció del pH; així, els intercanviadors forts estan completament ionitzats en un ampli rang de pH mentre que la càrrega dels intercanviadors febles depèn d'un rang de pH més petit.

Taula 1. Característiques generals dels Sephadex d'intercanvi iònic DEAE-50 i CM-50.

	Sephadex DEAE-50	Sephadex CM-50
Tipus d'intercanviador	Mixt, barreja de intercanviadors aniònics forts (proporció 1:2)	Intercanviador catiònic feble
Grup funcional principal	Dietilaminoetil	Carboximetil
Ió contrari	Clorur	Sodi
pH òptim de treball recomanat	2-9	6-10
Mol wt rang	30000 – 100000	
Forma	Esfèrica, 40-125 µm en la forma seca	
Estructura	Dextrà amb unions entrecreuades.	
Estabilitat física	El volum pot variar a causa de canvis en el pH i la força iònica	
Autoclavable	En forma de pols durant 30 min a 120°C a pH 7	

[[http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/EF46F215C5BF2A99C1256EB40044A96E/\\$file/18111758AA.pdf](http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/EF46F215C5BF2A99C1256EB40044A96E/$file/18111758AA.pdf)]

1.6.2. Els glass beads i la llana de vidre

Els glass beads són unes petites boletes de vidre que es comercialitzen o bé no rentades, i en aquest cas el diàmetre oscil·la entre 106 i 600 µm, o bé tractades amb àcid, essent el seu diàmetre de 106 a 1.180 µm. Els glass beads són àmpliament usats en investigació amb diferents finalitats, com per exemple el trencament de cèl·lules i la filtració d'espermatozoides o microcarriers de DNA, i en la indústria, sobretot la química (Fig. 6).

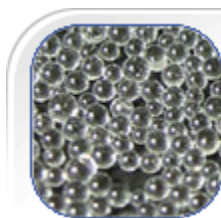


Figura 6. Imatge al microscopi dels glass beads

[<http://www.glassbeads.com.cn>]

La llana de vidre està formada per fibres de vidre que contenen majoritàriament diòxid de sílice; una fibra es considera una partícula amb un ratio de llargada-diàmetre de 3:1 o superior (Report

on Carcinogens, 1994). A més del diòxid de sílice s'hi poden incloure altres òxids de metall, els quals alteren la composició del vidre i li confereixen característiques específiques, com ara la llargada o la resistència elèctrica i/o tèrmica. La llana de vidre també és resistent a la corrosió per àcids minerals.

La llana de vidre té múltiples aplicacions, entre les quals destaquen la filtració de dosis sexuals (les fibres formen un entramat (Fig. 7) en el qual els espermatozoides queden retinguts) i l'eliminació de poliovirus de l'aigua corrent o marina (Vilagines i col., 1997); a nivell industrial s'usen com a aïllant acústic o tèrmic.

Malgrat les àmplies aplicacions, s'ha demostrat que en mides respirables (llargada de <3.2 mm a <7 mm; diàmetre de <0.18 a <1 mm) les fibres de llana de vidre són potencialment carcinogèniques (Report on Carcinogens, 1994).

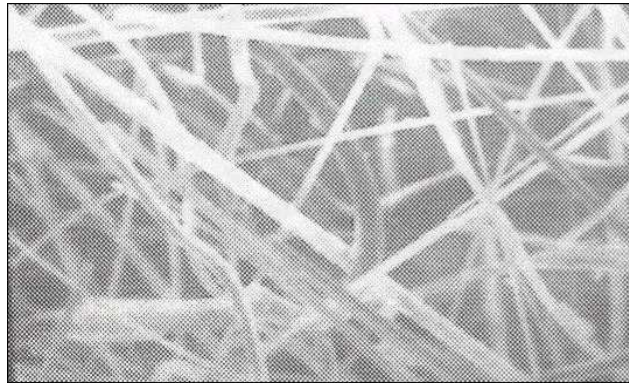


Figura 7. Entramat de fibres de llana de vidre, vistes al microscopi.

<http://www.mic-d.com/gallery/oblique/glasswool.html>

Material i Mètodes

2. MATERIAL I MÈTODES

2.1. MATERIAL

2.1.1. Característiques dels exemplars i obtenció de les mostres

En aquest estudi es van utilitzar 96 mascles porcins subfèrtils i postpuberals de la raça Piétrain, procedents de les empreses Semen Cardona (Cardona, el Bages) i Selecció Batallé (Riudarenes, la Selva).

Atenent als criteris establerts per Bonet i col. (1995), Briz i col. (1995) i Pinart i col. (1999) i emprant la terminologia de la WHO (1999), els mascles es van classificar com a mascles astenoteratonecrospermics ($n=58$), caracteritzats per una baixa motilitat, morfologia i vitalitat espermàtiques; mascles astenospèrmics ($n=7$), amb baixa motilitat espermàtica; mascles astenoteratospèrmics ($n=6$), amb baixa motilitat i morfologia espermàtiques; mascles teratospèrmics amb >10% d'anomalies cefàliques ($n=22$); mascles teratospèrmics amb >10% d'anomalies a la cua ($n=3$) i mascles teratospèrmics amb >8% d'anomalies cefàliques i >10 % anomalies de la cua ($n=8$).

Les mostres de semen es van obtenir pel mètode de la munta sobre maniquí i masturbació manual. La fracció espermàtica es va recollir en un termos a 37°C en el qual prèviament s'havia col·locat una gasa per eliminar la fracció de mucina. La fracció espermàtica es va diluir a la proporció 1:6 amb diluent BTS (Tecnovit, Espanya) i es va al·licotar en dosis seminals de 80 ml, les quals es van transportar refrigerades des de les instal·lacions de Selecció Batallé i Semen Cardona al laboratori de Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana de la Universitat de Girona.

2.1.2. Característiques de les diferents reïnes

Les dosis seminals dels mascles problema es van filtrar en 8 tipus de reïnes diferents: 4 reïnes de Sephadex neutre, 2 reïnes de Sephadex iònic, 1 reïna de llana de vidre i 1 reïna de glass beads.

Les reïnes de Sephadex neutre emprades van ser: G-25 Medium, G-50 Fine, G-50 Medium i G-75, les quals foren adquirides a la firma comercial Amersham Biosciences (Uppsala, Suècia). Aquests quatre tipus de reïnes de Sephadex neutre difereixen entre si per la mida de les boletes un cop hidratades; així les boletes de G-25 Medium presenten un diàmetre que varia entre 85 i 260 μm , les boletes de G-50 Fine entre 40 i 160 μm , les boletes de Sephadex G-50 Medium entre 100 i 300 μm , i les boletes de G-75 entre 90 i 280 μm . El rang de pH òptim oscil·la entre 2 i 13 pel Sephadex G-25 Medium, i entre 2 i 10 pels tres restants.

Pel que fa a les reïnes de Sephadex iònic (Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia), es va utilitzar la reïna aniònica DEAE-50 amb un diàmetre del porus de les boletes hidratades d'entre 182-214 μm i un rang de pH òptim de treball entre 2-9, i la reïna catiònica CM-50 amb un diàmetre de les boletes hidratades de 221-250 μm i un rang de pH òptim de treball d'entre 6-10. La filtració amb la reïna de llana de vidre (Sigma, USA) es va fer utilitzant fibres específiques per a investigació. Finalment, per a la filtració amb glass beads (Sigma, USA) es van emprar boletes de vidre inerts d'un diàmetre entre 150-212 μm .

2.1.3. Característiques dels diferents fluorocroms

En el present treball s'utilitzen els fluorocroms bis-benzamida i iodur de propidi (IP) (Sigma, St. Louis, MO) per al doble marcatge del nucli. Ambdós fluorocroms travessen les membranes espermàtiques i s'uneixen de forma específica al DNA, i s'exciten en ser irradiats amb llum ultraviolada. El fluorocrom bis-benzamida travessa les membranes intactes de les cèl·lules vives i emet fluorescència blava de 488 nm un cop unit al DNA; el fluorocrom IP, en canvi, travessa les membranes alterades de les cèl·lules mortes o no viables i emet fluorescència vermella de 617nm quan s'uneix al DNA (Love i col., 2003).

Per al marcatge de l'acrosoma s'usa la lectina SBTI conjugada amb el fluorocrom Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). Aquest fluorocrom presenta unes característiques espectrals semblants a les de FITC, essent el seu pic màxim d'excitació de 495 nm i el seu pic d'emissió de 519 nm.

Finalment, per a la detecció de l'estat de la beina mitocondrial s'empra el fluorocrom MitoTracker®Green FM (Molecular Probes Inc., Eugene, OR), el qual s'excita a 490 nm i emet fluorescència verda i brillant a una longitud d'ona de 516 nm. L'emissió de fluorescència té lloc quan el fluorocrom s'acumula als lípids mitocondrials i en solució aquosa no emet fluorescència.

2.2. MÈTODES

2.2.1. Desenvolupament d'un protocol de múltiple marcatge amb fluorocroms

Per al desenvolupament del protocol de múltiple marcatge es va procedir a determinar la concentració i el temps d'incubació més idonis de cada fluorocrom per separat. A continuació es van combinar els diferents fluorocroms per tal d'ajustar els temps i les concentracions i obtenir un marcatge fiable de cadascun dels compartiments espermàtics.

El marcatge del nucli es va fer incubant els espermatozoides durant 10 minuts a 37°C amb 1 μl de solució de bis-benzamida 5 μM i afegint posteriorment a la solució 6 μl de iodur de propidi 2

mM i de nou es va incubar la preparació a 37°C durant 10 minuts més d'acord amb el protocol descrit per Juonala i col. (1999).

Per al marcatge dels mitocondris amb MitoTracker®Green FM es van assajar diferents concentracions (20, 50, 100 i 200 nM) a diferents temps d'incubació a 37°C: 15, 20, 25 i 30 minuts. De totes les condicions assajades la que va proporcionar un marcatge més intens i no inespecífic de la beina mitocondrial va ser la incubació a una concentració de fluorocrom de 100 nM durant 20 minuts.

Pel marcatge de l'acrosoma amb Alexa Fluor® 488-SBTI conjugate es va provar un rang de concentracions d'1 a 15µM (1, 2, 3, 4, 5, 10 i 15 µM) i un de temps d'exposició de 5, 10, 15 i 20 minuts a 37°C (5, 10, 15 i 20 minuts). La incubació dels espermatozoides durant 20 minuts a una concentració de fluorocrom de 15 µM va permetre marcar l'acrosoma de forma intensa i específica.

A partir dels resultats obtinguts en els assajos per determinar les condicions de concentració i de temps d'incubació dels fluorocroms MitoTracker®Green FM i Alexa Fluor® 488-SBTI conjugate es va decidir que el temps més òptim d'exposició era de 20 minuts per ambdós fluorocroms. Una vegada determinat el temps, es van fer proves per comprovar si funcionava la incubació conjunta dels dos fluorocroms. Així doncs, es van incubar espermatozoides amb MitoTracker®Green FM a una concentració de 100 i 200 nM conjuntament amb Alexa Fluor® 488-SBTI conjugate a concentracions de 5, 10, 15 i 20 µM. A partir de les proves preliminars es va establir que les concentracions més òptimes pel marcatge de la beina mitocondrial i de l'acrosoma eren de 100 nM pel MitoTracker®Green FM i de 15 µM Alexa Fluor® 488-SBTI conjugate, respectivament.

Un cop ajustades les concentracions i temps d'incubació amb els quatre fluorocroms es va establir el protocol de múltiple marcatge que es detalla en l'apartat 2.2.3.2.b.

2.2.2. Determinació de les condicions òptimes de filtració en les diferents columnes

Diversos estudis han demostrat que el procés de filtració de les dosis seminals varia en funció de: 1) l'alçada de llit de Sephadex, 2) la velocitat del flux de sortida, 3) la dilució de treball de la dosi abans de filtrar, 4) la presència o absència d'un filtre de polipropilè a la columna i 5) la temperatura de treball al laboratori (Mogas i col., 1998; Cisale i col., 1999, 2001). Així doncs, prèviament al treball experimental, es van realitzar diverses proves preliminars a fi d'establir les condicions més idònies per a la filtració de les dosis seminals de mascles porcins, que permetessin recuperar un nombre màxim d'espermatozoides viables i funcionals. Els resultats

d'aquestes proves van permetre determinar que l'alçada mitjana del llit en tots els tipus de Sephadex neutre havia de ser de 10 ± 0.5 cm i el flux de sortida d'1 ml/20 segons.

Per a les columnes de Sephadex DEAE-50 i Sephadex CM-50 l'alçada del llit més adequada és, respectivament, de 2.5 ± 0.5 cm i 5.0 ± 0.5 cm i el flux de sortida d'1ml/40 segons en ambdós casos. A més, per eluir les dosis i regular el flux de sortida va ser necessari utilitzar una bomba peristàtica.

Per a les columnes de llana de vidre i glass beads el flux de sortida més idoni es va establir, també, en 1ml/40 segons, mentre que l'alçada de les reïnes es va fixar en 2.0 ± 0.5 cm per a la llana de vidre i 10.0 ± 0.5 cm per als glass beads.

La dilució de la fracció rica de l'ejaculat prèvia filtració es va establir en 1:6. Les proves preliminars realitzades van permetre determinar que la filtració de dosis seminals sense diluir provoca la colmatació de les columnes, és a dir, les columnes se saturen de manera que no és possible l'obtenció de filtrat. Contràriament, amb la dilució estàndard 1:10, les dosis seminals queden massa diluïdes i la fracció recollida presenta una concentració molt baixa de manera que no és possible fer una valoració òptima de la seva qualitat espermàtica. La fracció espermàtica de l'ejaculat es va diluir amb diluent BTS. Finalment, la temperatura de treball òptima es va establir en 23°C, que és la temperatura mitjana de treball de la majoria de laboratoris i que és fàcilment regulable amb aparells d'aire condicionat.

2.2.3. Anàlisi de la qualitat espermàtica

L'anàlisi de la qualitat espermàtica de les dosis seminals es va fer a partir de la valoració dels paràmetres següents: la concentració espermàtica, la motilitat espermàtica, la morfologia espermàtica i la vitalitat espermàtica. Durant la posada a punt del protocol del múltiple marcatge amb fluorocroms, la vitalitat espermàtica es va valorar per duplicat, a partir del marcatge amb fluorocroms i a partir del test d'eosina-nigrosina. Un cop validada la tècnica, l'anàlisi de la vitalitat espermàtica es va fer només emprant el múltiple marcatge amb fluorocroms.

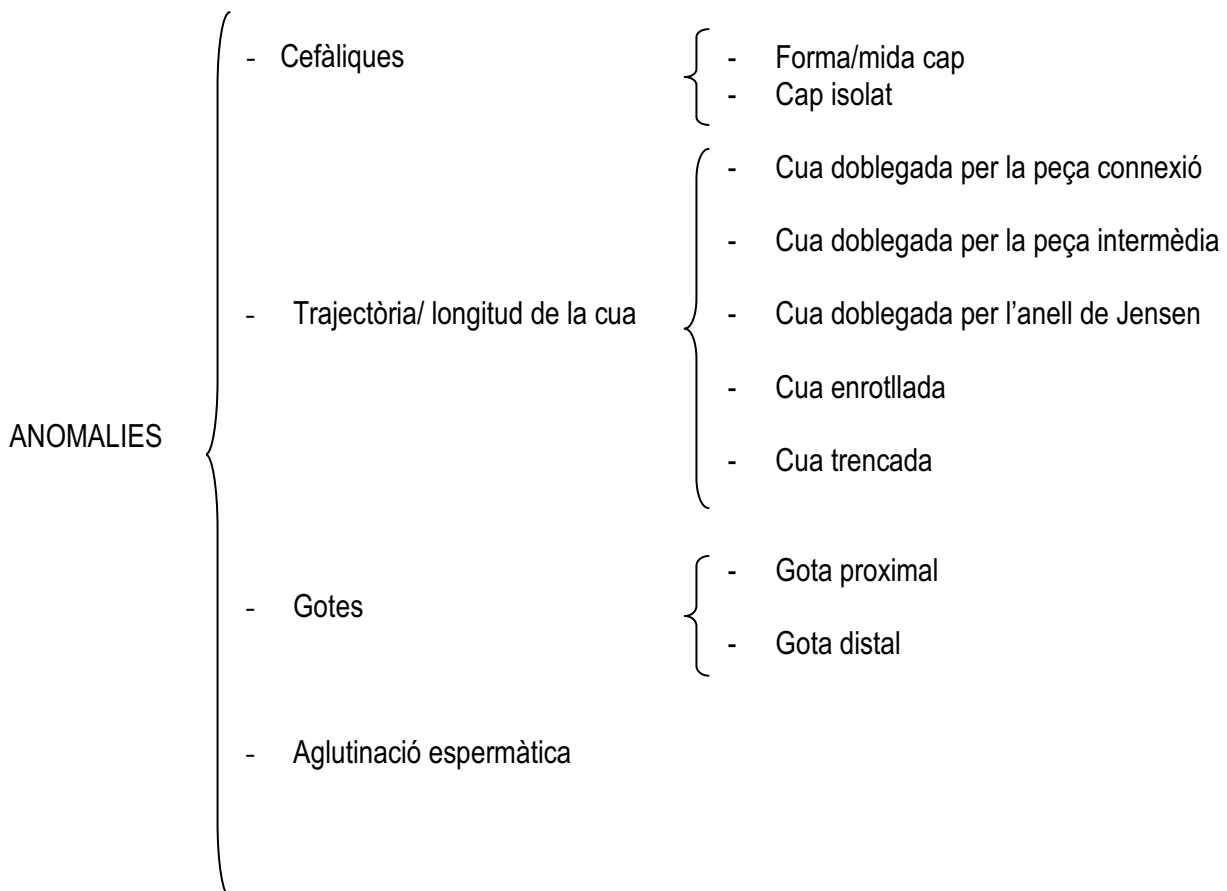
D'altra banda, per tal de determinar els efectes de la filtració sobre la qualitat espermàtica de les dosis seminals, aquestes es van analitzar abans i després de la seva elució.

2.2.3.1. Concentració, motilitat i morfologia espermàtiques

Per a l'anàlisi de la concentració, la motilitat i la morfologia espermàtiques es va emprar el programa informàtic SCA@2002 Producció (Microptic, Barcelona. Versió 2003), equipat amb un software associat a un microscopi òptic de contrast de fases.

La determinació de la motilitat espermàtica segueix el següent procediment: 1) dipositeu 20 µl de la mostra prèviament temperada a 37°C durant 15-20 minuts en una cambra de Makler també a 37°C disposada damunt una placa calefactora, 2) analitzeu automàticament la mostra en diferents camps comptant un mínim de 300 espermatozoides i distingint entre mòbils i immòbils. Aquest programa informàtic també dóna el valor de la concentració espermàtica en milions d'espermatozoides per ml i milions d'espermatozoides totals per l'ejaculat.

Per a la valoració de la morfologia espermàtica es dipositen 5 µl de mostra en un portaobjectes i es deixen a temperatura ambient fins que els espermatozoides queden immòbils. A continuació, s'analitza la mostra al microscopi òptic de contrast de fases positives a 200x. El programa informàtic marca per defecte tots els espermatozoides que hi ha en un camp com a espermatozoides madurs. En el cas que els espermatozoides siguin immadurs o aberrants, cal indicar de quin tipus d'anomalia es tracta. A l'esquema següent es mostra el criteri de classificació de les anomalies espermàtiques utilitzat en aquest treball (Briz i col., 1996; Pinart i col. 1999; Bonet i col., 2000. Sancho i col., 2002):



Per a l'anàlisi de la morfologia espermàtica es fan tres recomptes de 100 espermatozoides per a cada dosi seminal. Els resultats s'expressen com la mitjana dels tres recomptes.

2.2.3.2. Vitalitat espermàtica

a) Vitalitat espermàtica amb eosina-nigrosina (modificat de Sancho i col., 2002):

1. Poseu una gota de semen sobre un portaobjectes col·locat damunt una placa escalfadora a 37°C i barregeu-la amb 5 µl d'eosina Y al 5% en solució salina isotònica (9 g NaCl/l).
2. Afegiu 5 ml de nigrosina al 10% i barregeu. Feu l'extensió.
3. Observeu i feu tres recomptes de 100 espermatozoides cadascun discernint entre els espermatozoides tenyits de vermell per l'eosina (espermatozoides morts o no viables) i els espermatozoides no tenyits (espermatozoides vius o viables). Els resultats s'expressen com el percentatge d'espermatozoides vius.

b) Vitalitat espermàtica amb múltiple marcatge amb fluorocroms

L'anàlisi de la vitalitat espermàtica de les dosis seminals abans i després de filtrar en diferents reïnes s'ha fet mitjançant el mètode de la múltiple tinció fluorocròmica (Bussalleu i col., 2005; Pinart i col., 2006), tal i com es descriu a continuació (Article 1):

b.1) Tinció amb iodur de propidi /bis-benzimida

1. Barregeu 1 ml de la fracció espermàtica diluïda amb 1 µl de la solució de bis-benzimida 5 µM en un eppendorf (Eppendorf, Alemanya) de 2 ml, i deixeu-ho incubar a l'estufa a 37°C durant 10 minuts. La concentració ha de ser d'uns 25-75 x 10⁶ espermatozoides/ml; si la concentració de la mostra no s'ajusta a aquest rang un cop realitzades les dilucions pertinents, cal tornar a diluir.
2. Barregeu 1 ml de la solució obtinguda en el pas anterior amb 6µl de la solució de iodur de propidi 2 mg/ml durant 10 minuts també a l'estufa de 37°C.
3. Centrifugueu la solució a 1500g durant 12 minuts i descarteu el sobrenedant.

b.2.) Tinció amb MitoTracker FM i Alexa Fluor® 488 Conjugate (Molecular Probes)

4. Ressuspeneu el "pellet" obtingut a l'apartat 3 amb 1 ml del fluorocrom Mitotracker® Green FM a una concentració de 100 nM i amb 1 ml de Alexa Fluor® 488 Conjugate-SBTI a una concentració de 15 µg/ml.
5. Deixeu incubar la solució preparada durant 20 minuts a 37°C.
6. Centrifugueu la mostra durant 12 minuts a 1500g i descarteu el sobrenedant.
7. Ressuspeneu el "pellet" amb 1 ml de diluent prèviament temperat a 37°C.
8. Guardeu a l'estufa fins al moment de l'observació.

9. Observeu al microscopi òptic de fluorescència. Les observacions es van realitzar en un microscopi òptic de fluorescència Leica DMR-XA i es van emprar els següents filtres:
- FITC: permet observar simultàniament les mostres amb fluorescència verda emesa tant per Mitotracker® Green FM com per Alexa Fluor® 488 Conjugate-SBTi i una dèbil tinció vermella emesa per les cèl·lules mortes a les quals ha penetrat el iodur de propidi.
 - DAPI: permet observar els nuclis amb fluorescència blava (cèl·lules viables)
 - Rodamina: permet la detecció de nuclis amb fluorescència vermella (cèl·lules no viables).

Els resultats del marcatge amb aquests quatre fluorocroms es detallen a la Taula 1.

Taula 1. Classificació dels espermatozoides en funció del múltiple marcatge amb fluorocroms: bis-benzamida, iodur de propidi, Mitotracker® Green FM i Alexa Fluor® 488 Conjugate-SBTi.

FLUORESCÈNCIA			Classificació
Nucli	Beina mitocondrial	Acrosoma	
Blava	Verda	Verda	Espermatozoide viu amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes
	Verda	No marcat	Espermatozoide viu amb la beina mitocondrial intacte i l'acrosoma alterat
		Glòbul verd escampat	
No marcat	Verda	Espermatozoide viu amb la beina mitocondrial alterada i l'acrosoma intacte	
Vermella	Verda	Verda	Espermatozoide mort amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes
	Verda	No marcat	Espermatozoide mort amb la beina mitocondrial intacte i l'acrosoma alterat
		Glòbul verd escampat	
	No marcat	Verda	Espermatozoide mort amb la beina mitocondrial alterada i l'acrosoma intacte
No marcat	No marcat	Glòbul verd escampat	Espermatozoide mort amb la beina mitocondrial i l'acrosoma alterats
	Glòbul verd escampat		

2.2.3.3. Test de resistència hipoosmòtica (ORT)

L'anàlisi del test de resistència osmòtica s'ha fet seguint el protocol descrit per Schilling i col. (1986) i modificat per Rodríguez-Gil i Rigau (1996) als laboratoris del Departament de Medicina i Cirurgia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

1. Agafeu 100 µl de semen d'una mostra i dipositeu-los en un tub eppendorf (Eppendorf, Alemanya) amb 900 µl de solució hipoosmòtica de citrat de sodi a l'1% (w/v) ajustat a un pH de 7.4 (pressió osmòtica 102 ± 5 mOsm) i deixeu-ho en un bany termostatitzat a 37°C durant 15-30 minuts.
2. Simultàniament, agafeu 100 µl de la mateixa mostra i poseu-los en un altre tub eppendorf amb 900 µl d'una solució isotònica de citrat de sodi al 3.2% (w/v; pressió osmòtica 305 ± 7 mOsm; pH, 7.4). Dipositeu-lo en un bany a 37°C durant 15-30 minuts.
3. Agafeu 100 µl de cada tractament i centrifugueu 30 segons a 1000xg. Elimineu el sobrenedant i amb 10 µl de sediment de cadascun del tubs feu una extensió i tenyiu-la amb eosina-nigrosina segons el protocol de Bamba (1988).
4. Feu un recompte del percentatge d'alteracions acrosòmiques i apliqueu la fórmula de Sánchez (1991) per a la determinació del percentatge d'ORT:

$$\text{ORT (\%)} = 100 - \frac{(\% \text{ alteracions acrosòmiques en medi isosmòtic}) + (\% \text{ alteracions acrosòmiques en medi hipoosmòtic})}{2}$$

2.2.3.4. Test HRT

El test de la HRT, que indica la capacitat de resistència a canvis sobtats d'osmolaritat dels espermatozoides de porcí; es va realitzar als laboratoris del Departament de Medicina i Cirurgia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

1. Agafeu 100 µl de semen d'una mostra i incubeu-los amb 900 µl d'una solució hiperosmòtica (osmolaritat: ± 1100 mOsm), ajustada a pH 7.4 de glucosa 0.9M i deixeu-ho durant 5 minuts a 37°C en un bany termostatitzat.
2. Preneu 100 µl del mostra i poseu-los en un eppendorf amb 1000 µl d'una solució isosmòtica de Krebs-Ringer-Henseleit (composició: 25 mM NaHCO₃, 118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄ i 1.2 mM MgSO₄·7H₂O; pH 7.4) a 37°C. Seguidament, centrifugueu ambdues solucions espermàtiques, la hiper i la isotònica a 600 g durant 5 minuts. S'elimina el sobrenedant excepte 50 µl.
3. Realitzeu una tinció vital doble Blau Tripà/Giemsa amb els 50 µl de sobrenedant obtinguts en l'apartat anterior i analitzeu al microscopi òptic a 1000X 300 espermatozoides. Els espermatozoides resistents tenen una coloració blau pàl·lid/gris i els espermatozoides no resistents són de color blau intens.

4. Calculeu el percentatge de resposta a HRT mitjançant la fórmula següent:

$$\text{VHUPER (resultat de viabilitats test HRT)} = \frac{\text{VD (percentatge d'espermatozoides viables observats en medi isosmòtic)}}{\text{VU (percentatge d'espermatozoides viables observats en medi hipertònic)}}$$

2.2.3.5. Determinació del ritme de formació de L-lactat

L'activitat metabòlica dels espermatozoides s'ha valorat a partir de l'anàlisi de la producció de L-lactat, realitzada als laboratoris del Departament de Medicina i Cirurgia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona seguint la tècnica descrita per Rodríguez-Gil i Rigau (1995).

1. Incubeu les mostres de semen durant 1h a 37°C en una solució isosmòtica a una dilució 1:10. La solució isosmòtica conté un 2.94% (w/v) de citrat sòdic i un 5.4% de fructosa, a pH 7.4 i una pressió osmòtica de 300 ± 0.5 mOsm.
2. A continuació centrifugueu la solució durant 20 minuts a 2xg.
3. Centrifugueu el pellet a 3000xg durant 20 minuts i determineu la quantitat de proteïna, mitjançant la tècnica descrita per Bradford (1976) amb el Bio-Rad Assay kit (Bio-Rad Laboratories).
4. A partir del sobrenedant obtingut a l'apartat 2, utilitzeu el mètode enzimàtic descrit per Noll (1984) aplicat a un autoanalitzador Cobas Bio (Roche Biomedicals, Basilea, Suïssa) per obtenir la quantitat de L-lactat.
5. La producció de L-lactat s'expressa com a $\mu\text{mol de L-lactat/mg proteïna} \times 60 \text{ min}$.

2.2.4. Filtració de les dosis seminals en columnes

La filtració de les dosis seminals de mascles subfèrtils es va fer en dues fases. En una primera fase es van filtrar dosis seminals de mascles astenoteratonecrospermics en 4 columnes de Sephadex neutre: G-25, G-50F, G-50M i G-75 (Article 2), i en una segona fase es va procedir a la filtració de dosis seminals de mascles teratospèrmics, astenospèrmics i astenoteratospèrmics en 4 columnes: Sephadex aniònic, Sephadex catiònic, llana de vidre i glass beads (Article 3). En ambdues fases es va procedir de forma idèntica: de cadascuna de les dosis seminals es van obtenir 5 alíquotes de 10 ml cadascuna, de les quals 4 es van filtrar en columna, mentre que la cinquena alíquota, no filtrada, es va diluir en 40 ml de diluent.

2.2.4.1. Muntatge de les columnes

Prèviament a la filtració de les dosis es va procedir a la rehidratació de les reïnes i empaquetat de les columnes. El protocol específic varia en funció del tipus de reïna:

a) Rehidratació del Sephadex (neutre i iònic) i empaquetat de les columnes

1. Peseu x g de Sephadex i deixeu-los hidratar amb x ml de diluent BTS en un vas de precipitats tapat amb parafilm (American National Can TM, USA). Els grams de Sephadex a rehidratar i el volum de diluent a emprar varien segons el tipus de Sephadex, ja que en cada cas la mida del porus és diferent, i per tant, també ho serà el volum final que ocupi.
2. Un cop preparat el Sephadex, guardeu-lo a la nevera a 4° C i fins unes 12-24 hores abans del muntatge de les columnes. Si es treu de la nevera i es munten de seguida, hi ha la possibilitat que es formin bombolles que podrien interferir en el filtratge.
3. Munteu les columnes de vidre (16/20) (Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia) sobre els seus suports i pinceu la part inferior amb una pinça Hoffman. Afegiu aproximadament 2 ml de diluent BTS i, seguidament, comenceu a empaquetar la columna tal com es mostra a la Figura 1. Quan hàgiu dipositat els 2 ml de Sephadex, obriu la pinça Hoffman i deixeu que la columna es vagi empaquetant, tot afegint-hi Sephadex fins a assolir l'alçada de llit desitjada. En tot moment s'ha de tenir cura que el llit de Sephadex no quedi sec.
4. Deixeu la columna empaquetada i hidratada, és a dir, amb la pinça Hoffman tancada fins al moment de la seva utilització.

b) Preparat i empaquetat de les columnes de glass beads

1. Renteu uns 100g de producte dins d'un vas de precipitats amb diluent. Com que els glass beads que s'usen no són rentats, unes 24 hores després de deixar-los amb el diluent, es filtren i es renten amb 1L de diluent BTS. Un cop netes les boletes de vidre torneu-les a deixar amb el mateix diluent fins al moment de l'empaquetat de les columnes.
2. Per a l'empaquetat, seguïu el mateix procediment descrit per a les columnes de Sephadex (Fig. 1).

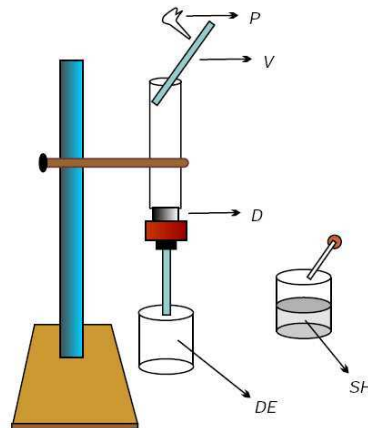


Figura 1. Procés d'empaquetat de les columnes. Amb una vareta de vidre, disposada en diagonal i tocant la paret de la columna, es deixa que la reïna hidratada i afegida amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur llisqui suaument sobre d'aquesta. P, pipeta Pasteur amb reïna; D, diluent a dins la columna, previ empaquetat; V, vareta de vidre; DE, diluent eluït; SH, reïna hidratada.

c) Preparat i empaquetat de les columnes de llana de vidre

1. Dipositeu les fibres de llana de vidre en un vas de precipitats que contingui diluent BTS.
2. Amb l'ajuda d'unes pinces i unes tisores talleu les fibres ja molles en trossets d'aproximadament 1 cm de llargada.
3. Deixeu les fibres amb diluent fins al moment de l'empaquetat de les columnes.
4. Quan s'hagin d'empaquetar, disposeu aproximadament 2 ml de diluent dins una columna amb la pinça Hoffman tancada. Seguidament, amb unes pinces aneu dipositant trossets de fibra i amb una espàtula premseu al fons fins a l'alçada desitjada. En aquest cas es forma un cilindre de fragments de llana de vidre que s'ha de procurar que no quedi massa compacte i es formi una massa molt densa, a través de la qual no podria penetrar la dosi seminal i per tant no es podrien recuperar els espermatozoides.
5. La columna empaquetada es deixa amb diluent per tal que les fibres no quedin seques i amb la pinça Hoffman tancada.

2.2.4.2. Filtració de les dosis seminals i regulació del flux

Prèviament a la filtració de les dosis seminals cal obrir la pinça Hoffman i deixar que el diluent utilitzat per a l'empaquetat de la columna vagi eluint-se. Mentre el diluent s'elueix cal regular el flux de sortida; per això s'utilitza una proveta amb la qual es determina quants ml surten per minut, i es va regulant el grau de tancament de la pinça Hoffman fins a aconseguir que la velocitat de sortida sigui la desitjada: 1ml/20 per a les columnes de Sephadex neutre i 1ml/40 segons per a les columnes de Sephadex aniònic i catiònic, de llana de vidre i de glass beads.

Un cop regulat el flux i el menisc que forma el diluent toca el llit de la reïna, s'afegeix una alíquota de 10 ml de la dosis seminal diluïda a la proporció 1:6 i es connecta el dispositiu, tal com es mostra a la Figura 2. L'alíquota afegida s'elueix amb un volum total de 40 ml de diluent BTS.

2.2.4.3. Recollida de les alíquotes filtrades

Immediatament després d'afegir l'alíquota i el diluent es recull tot el filtrat fins que el menisc torna a tocar el llit de la reïna. La mostra eluïda es guarda a 15°C fins al moment de la seva anàlisi.

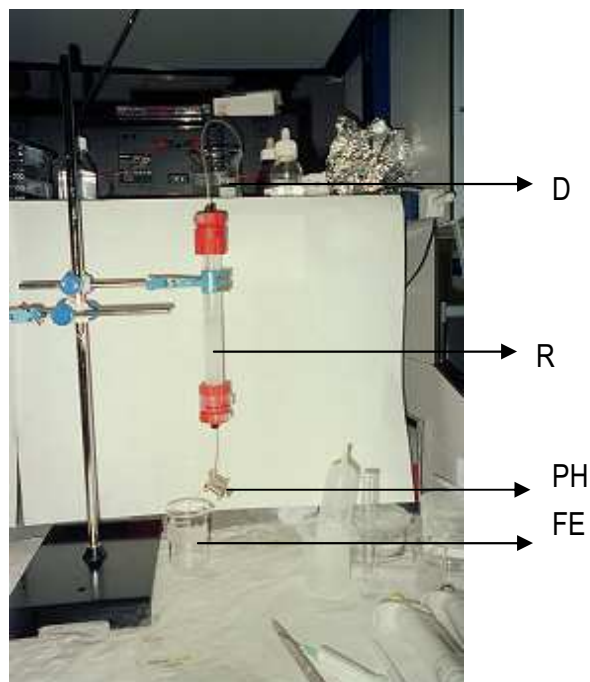


Figura 2. Dispositiu de les columnes després d'afegir la dosi seminal a filtrar i connectar el dispositiu d'elució. D, diluent; PH, pinça Hoffman; FE, fracció de la dosis seminal eluïda de la columna; R, reïna.

2.2.5. Anàlisi estadística

Per validar la tècnica del múltiple marcatge amb fluorocroms es va fer, d'una banda, una anàlisi comparativa de la freqüència d'espermatozoides viables obtinguda per fluorescència i la freqüència d'espermatozoides viables obtinguda amb eosina-nigrosina emprant el test ANOVA d'un factor, inclòs en el paquet estadístic SPSS per a Windows, versió 12.0 (Chicago, IL, USA). Per altra banda, els resultats del múltiple marcatge es van correlacionar amb els paràmetres convencionals de motilitat i morfologia espermàtiques mitjançant el coeficient de correlació de Pearson. En ambdós casos, els valors de P superiors a 0.05 es van considerar significatius (Article 1).

Per determinar l'efecte dels diferents tipus de columnes de Sephadex neutre, Sephadex aniònic, Sephadex catiònic, llana de vidre i glass beads sobre les dosis seminals de mascles problema es va emprar el test ANOVA d'un factor, amb un nivell de significació de $P < 0.05$ i prèvia transformació arcsinus ($\sqrt{\text{variable}/100}$) de les variables, excepte per a la concentració espermàtica, que es va aplicar una transformació logarítmica. En tots els grups de mascles problema s'ha comparat la qualitat espermàtica de les dosis abans i després de la filtració amb cadascuna de les quatre columnes de Sephadex neutre (Article 2) i amb les columnes de Sephadex A-50, Sephadex C-50, llana de vidre i glass beads (Article 3).

Resultats

Article 1

Eva Bussalleu, Elisabet Pinart, Marc Yeste, Mailo Briz, Silvia Sancho, Nuria Garcia-Gil, Elena Badia, Judit Bassols, Anna Pruneda, Isabel Casas, Sergi Bonet. "Development of a protocol for a multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa". *Microscopy research and technique*. Vol. 68, issue 5 (1 december 2005) : 277-283

DOI: 10.1002/jemt.20246

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/112159937/PDFSTART>

Received: 3 May 2005; Accepted: 21 July 2005

Biotechnology of Porcine Reproduction, Department of Biology-INTEA, University of Girona, Campus de Montilivi s/n, 17071 Girona, Spain

ABSTRACT

The aim of this study was to design a simple and reliable method for the simultaneous evaluation of the nucleus, the acrosome, and the mitochondrial sheath of boar spermatozoa. Sperm samples coming from healthy and sexually mature Pietrain boars were incubated with two nuclear fluorochromes - bis-benzamide specific for viable cells, and propidium iodide specific for nonviable cells - the fluorochrome Mitotracker® Green FM specific for functional mitochondria, and the lectin *Trypsin inhibitor* from Soybean (SBTI) conjugated with the fluorochrome Alexa Fluor® 488 specific for proacrosin. The results obtained from assessing the functional status of the spermatozoa using fluorochromes were compared with the conventional sperm parameters of sperm vitality using the eosin exclusion test (EE test), and sperm motility and morphology using the computer-assisted semen analyzer SCA®2002Producció. Applying the multiple staining test, it was found that the frequency of viable spermatozoa with intact acrosome and intact mitochondria was not different from the frequency of viable spermatozoa obtained with the EE test, and also correlated positively with the frequency of motile spermatozoa and the frequency of mature spermatozoa. Therefore, this technique is useful to characterize the status of boar spermatozoa by assessing the nuclear, acrosomal, and mitochondrial integrity. Moreover, it provides reliable diagnostic information about the fertility potential of boars. *Microsc. Res. Tech.* 68:277-283, 2005. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

KEYWORDS

Sus domesticus • spermatozoa integrity • sperm vitality • artificial insemination

Article 2

E. Bussalleu, E. Pinart, MM Rivera, X. Arias, M. Briz, S. Sancho, N. García-Gil, J. Bassols, A. Pruneda, M. Yeste, I. Casas, T. Rigau, JE Rodriguez-Gil, S. Bonet. "Effects of filtration of semen doses from subfertile boars through neuter Sephadex columns". *Reproduction in domestic animals* Vol. 43, issue 1 (February 2008) : p. 48–52

DOI: <http://10.1111/j.1439-0531.2007.00853.x>

<http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1439-0531.2007.00853.x>

ABSTRACT

This study was designed to develop a method of improving the quality of sperm obtained from subfertile Piétrain boars. Seminal doses were filtered through neuter Sephadex™ columns (G-25 Medium, G-50 Fine, G-50 Medium and G-75, length 10 ± 0.5 cm, flow rate 1 ml/20 s). Doses were prepared by pooling 10 ml semen samples collected from 58 asthenoteratospermic boars and diluted the sperm-cell rich fraction 1 : 6 in Betsville thawing solution extender. Sperm quality was determined before and after the filtering process. Sperm morphology and motility were assessed using the computer program SCA®2002 production, and sperm vitality was evaluated by fluorescence multistaining. ORT and HRT tests were used to determine the osmotic resistance of spermatozoa, and metabolic performance was assessed by measuring L-lactate production. Results indicate that the filtration process rendered increased proportions of mature spermatozoa and of viable spermatozoa with an intact acrosome, nucleus and mitochondrial sheath. Sperm filtration led to decreased percentages of spermatozoa with proximal and distal droplets and of agglutinated spermatozoa, along with slightly diminished ORT values. HRT scores and L-lactate production were unaffected. Our findings indicate that filtering through a Sephadex column improves the sperm morphology and vitality of seminal doses obtained from subfertile boars, but produces no functional changes in the spermatozoa. All four column types yielded similar results.

Article 3 (enviat a The
Veterinary Journal, novembre
2007)

Improvement of sperm quality of boars affected by various pathologies using four different matrixes

Bussalleu^{a,*} E, Pinart^a E, Rivera^b MM, Briz^a M, Sancho^a S, Pruneda^a A, Yeste^a M, Casas^a I, Fàbrega A^a, Rigau^b T, Rodriguez-Gil^b JE, Bonet^a, S.

^aBiotecnologia de la Animal i Humana, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona, E-17071 Girona, Catalonia, Spain.

^bUnitat de Reproducció Animal, Dept. Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Catalonia, Spain.

* Corresponding author. Tel.: +34 972 41 83 66; fax: +34 972 41 81 50

E-mail address: eva.bussalleu@udg.edu

Running title: Improvement of sperm quality of subfertile boars

Abstract

The aim of this work is to develop a method to enhance the sperm quality of subfertile Piétrain boars affected by asthenospermia, asthenoteratospermia and teratospermia. Seminal doses were filtered through columns of DEAE Sephadex (length 2.5 ± 0.5 cm), CM Sephadex (length 5 ± 0.5 cm), glass wool (length 2 ± 0.5 cm) and glass beads (length 10 ± 0.5 cm) with an exit flow rate of 1ml/40 seconds in all cases. For each male 10 ml of the sperm cell-rich fraction, diluted at 1:6, were filtered. Sperm quality was assessed before and after filtration. Sperm morphology, sperm motility and sperm concentration were determined using the computer program SCA®2002 Production, and sperm vitality was evaluated by fluorescence multistaining. ORT and HRT tests were used to determine the osmotic resistance of spermatozoa, whereas L-lactate production estimated the metabolic activity. Results showed that filtration did alter neither the sperm concentration nor the frequency of spermatozoa with intact nucleus, plasma membrane, acrosome and mitochondrial sheath. Sperm motility diminished only after filtration of seminal doses from teratospermic boars. The frequency of mature spermatozoa increased in teratospermic boars with head anomalies and teratospermic boars with head and tail anomalies after filtration in the four matrixes, and in asthenospermic boars only after filtration in glass beads. The resistance of spermatozoa to hyposmotic medium decreased after filtration with the four types of matrixes, whereas L-lactate production and HRT values maintained constant. Our findings indicate that all matrixes had a similar effectiveness in enhancing the sperm quality of subfertile males without producing a significant loss of spermatozoa.

Keywords: Seminal doses, subfertile boars, column filtration, sperm quality.

Discussió general

4. DISCUSSIÓ GENERAL

Actualment els programes d'inseminació artificial (IA) estan àmpliament implantats en els centres de producció animal i han substituït la munta natural. Per a la correcta i exitosa implantació d'aquests programes es requereixen dosis seminals d'elevada qualitat espermàtica, a fi d'obtenir les màximes taxes de fertilitat i prolificitat (Vyt i col., 2004a). En els centres d'inseminació artificial (CIAs) l'avaluació de la qualitat espermàtica es fa a partir de l'anàlisi de la motilitat espermàtica, la morfologia espermàtica, la vitalitat espermàtica i la concentració espermàtica (Shibley, 1999; Vyt i col., 2004a).

La motilitat espermàtica és un paràmetre útil d'anàlisi de la qualitat espermàtica només quan tots els factors externs que la poden influir, des de la temperatura al temps d'incubació, així com el suport mecànic en el qual es col·loca la mostra per analitzar-la i el diluent usat, estan totalment controlats (Quintero-Moreno i col., 2004; Vyt i col., 2004b). Per a la determinació de la motilitat espermàtica els mètodes tradicionals són les tècniques videofotogràfiques (Rawlins, 1992; Lacey, 1999) i el recompte amb cambra, com la cambra de Makler (Pinart, 1997; Kvist i Björndahl, 2002; Sancho, 2002), la cambra de Neubauer (Imade i col., 1993), la cambra de Thoma-Zeib (Christensen i col., 2005) i la cambra de Bürker-Türk (Christensen i col., 2005). A més, el recompte amb cambra també permet determinar la concentració espermàtica de les mostres.

L'anàlisi de la morfologia espermàtica és essencial per a la determinació de la qualitat de les dosis seminals, ja que s'ha demostrat que existeix una correlació altament positiva entre la freqüència d'espermatozoides madurs i la fertilitat (Levine, 1999, Kumar i Rani, 1999). La morfologia espermàtica es pot avaluar al microscopi de contrast de fases i de contrast interferencial de Nomarski (Sancho, 2002), o mitjançant mètodes tintorials convencionals, com la tinció hematoxilina-eosina, la tinció de Giemsa i la tinció de Papanicolau modificada per a espermatozoides i mètodes panòptics ràpids com el mètode Panòptic Ràpid de QCA (Química Clínica Aplicada S.A.®) (Pinart, 1997; Pinart i col., 1998; Bonet i col., 1995, 2000; WHO, 2000; Sancho, 2002) o el mètode Diff-Quick (Sancho, 2002).

De totes maneres, l'avaluació de la morfologia, la motilitat i la concentració espermàtiques mitjançant tècniques òptiques és subjectiva i depèn molt de l'habilitat del tècnic analista (Jenkins, 2000). El desenvolupament de mètodes d'anàlisi computeritzat com el SCA (Semen Computer Analysis) o CASA (Computer Assisted Semen Analysis) que analitzen el moviment tant des d'un punt de vista qualitatiu com quantitatiu, al mateix temps que determinen la concentració i analitzen la morfologia espermàtica (WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002), ha permès reduir la

subjectivitat i estandarditzar els mètodes de recompte, aportant valors percentuals o mitjanes de les diverses característiques de l'espermatozoide, alhora que signifiquen un estalvi econòmic i de temps (Soler i col., 2006). Tot i els evidents avantatges d'aquests mètodes, també tenen diversos inconvenients. En el cas de la motilitat i la concentració espermàtiques el principal escull és la dificultat que tenen aquests programes per distingir entre espermatozoides i altres partícules presents a la mostra; això comporta una sobrevaloració de la concentració espermàtica i distorsions en el percentatge d'espermatozoides mòbils i immòbils. Per altra banda, el principal problema tècnic en l'anàlisi de la morfologia espermàtica és la resolució de les imatges i la nitidesa de la definició dels límits de l'espermatozoide (Soler i col., 2006).

La vitalitat espermàtica s'ha avaluat tradicionalment amb les tincions eosina-nigrosina (WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002; Sancho, 2002) i blau de tripà (Sánchez, 1991). Aquestes tincions es basen en què la membrana dels espermatozoides vius no deixa passar els colorants, mentre que la membrana dels espermatozoides morts o no viables és permeable al seu pas. Per tant, en les extensions que es visualitzen al microscopi òptic, els espermatozoides vius apareixen no tenyits i els morts tenyits. L'anàlisi de la vitalitat espermàtica també es pot fer a partir del marcatge amb fluorocroms que avaluen l'estabilitat de la cromatina, com el taronja d'acridina (Khalili i col., 2006; Talebi i col., 2007) o la cromomicina A3 (Talebi i col., 2007).

D'altra banda, l'anàlisi independent dels paràmetres clàssics de qualitat espermàtica no permet establir cap mena de correlació entre ells, mentre que l'avaluació conjunta de l'estat del nucli, la beina mitocondrial, la membrana plasmàtica i l'acrosoma és un bon indicador de la capacitat fecundant de l'espermatozoide (Pinart i col., 2006). Per aquest motiu, l'anàlisi clàssica dels paràmetres de qualitat espermàtica s'està substituint per tècniques de marcatge amb fluorocroms, mitjançant les quals és possible conèixer l'estat funcional de l'espermatozoide a partir de l'avaluació simultània de la integritat del nucli, de la beina mitocondrial, de la membrana plasmàtica i de l'acrosoma. Les mostres marcades amb fluorocroms es poden analitzar al microscopi de fluorescència o bé per citometria de flux (Watson i col., 1992; Garner i col., 1997). La determinació simultània de l'estat de dos o més parts de l'espermatozoide mitjançant les tècniques de tinció dual ha estat utilitzada en espècies d'interès productiu terrestres, com el gall d'indi (Donoghue i col., 1995), porc, ovella, conill i brau (Evenson i col., 1993; Garner i col., 1995), i aquàtiques (Segovia i col., 2000; Adams i col., 2003; Paniagua-Chávez i col., 2006).

A partir del marcatge amb fluorocroms és possible establir una correlació positiva entre la morfologia espermàtica i l'estat funcional de l'acrosoma (Langlois i col., 2005) i entre la vitalitat espermàtica i la integritat de l'acrosoma (D'Alessandro i Martemucci, 2003). En base a aquests estudis, en aquesta tesi doctoral s'ha dissenyat un mètode de múltiple marcatge en el qual

s'utilitzen fluorocroms específics per a l'acrosoma (Alexa Fluor® 488-SBTI), el nucli i la membrana plasmàtica (iodur de propidi/ bis-benzamida) i la beina mitocondrial (MitoTracker®Green FM). Mitjançant aquesta tècnica és possible correlacionar la vitalitat amb la capacitat fecundant dels espermatozoides ja que només es consideren com a viables, i per tant potencialment fèrtils, aquells que tenen el nucli, l'acrosoma, la membrana plasmàtica i la beina mitocondrial intactes. Els espermatozoides amb alteracions en com a mínim un d'aquests compartiments són incapaços de travessar les cobertes oocitàries i fecundar l'oòcit, i per tant, es consideren com a no viables (Juonala et al., 1999; Tollner et al., 2000; Ducci et al., 2002). A més del mètode desenvolupat en aquest treball existeixen altres protocols de múltiple marcatge amb fluorocroms. Així, en porcí existeix un protocol de múltiple marcatge amb fluorocroms en el que s'utilitza el SYBR-14/PI i Hoechst 3325 per l'avaluació del nucli, el iodur de 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine (JC-1) per la determinació de l'estat de la beina mitocondrial i de blau de Coomassie per a la valoració de la integritat de l'acrosoma (Huo i col., 2002). En bovins, Januskauskas i col. (2005) usen un mètode de marcatge amb fluorocroms per a citometria de flux basat en l'avaluació de l'estat del nucli (SYBR-14/Iodur de propidi), de l'estabilitat de la cromatina (taronja d'acridina), del potencial de la membrana mitocondrial (Mitotracker Deep Red/SYBR 14), de la integritat de l'acrosoma (SYBR 14/PE-PNA/PI) i de l'estabilitat de la membrana plasmàtica (Merocyanine 540/YO-PRO 1/Hoechst 3333429). En bocs s'ha descrit un protocol d'avaluació simultània de l'estat de l'acrosoma i del nucli utilitzant la lectina PSA conjugada amb el fluorocrom FITC i el iodur de propidi, respectivament (Sukardi i col., 1997).

En els CIAs de porcí s'usen mascles Piétrain d'elevada qualitat genètica amb la finalitat d'obtenir cries híbrides amb una bona qualitat de la carn. Ara bé, sovint la qualitat dels seus ejaculats és baixa i això fa que s'hagin de descartar dels programes d'IA, amb les conseqüents pèrdues econòmiques que aquest fet comporta.

L'aplicació de mètodes de preparació de dosis seminals permet eliminar les cèl·lules mortes del semen i incrementar d'aquesta manera la qualitat espermàtica de les dosis. Això suposa tres avantatges importants: la inseminació de femelles amb un nombre menor d'espermatozoides, l'augment del nombre de dosis útils que es poden obtenir de cada ejaculat i l'augment de la fertilitat (Fernández i Cisale, 1992; Cisale i col., 2001). El mètode ideal de preparació de dosis seminals seria aquell que seleccionés tots els espermatozoides potencialment fèrtils de l'ejaculat i alhora minimitzés la contaminació i els danys col·laterals del processat (Mortimer i Mortimer, 1992). En aquest sentit s'han desenvolupat nombroses tècniques de preparació i millora de la

qualitat espermàtica de dosis seminals destinades a IA, com els mètodes de migració espermàtica (swim-up o swim-down), els gradients de densitat (per exemple, Percoll) o la filtració en substàncies adhesives com el Sephadex, la llana de vidre o els glass beads (Morrell , 2006), per bé que no existeix cap mètode de selecció d'espermatozoides que compleixi tots els criteris d'idoneïtat (Hammadeh i col., 2001a). Entre tots els procediments de millora de la qualitat espermàtica, la filtració en substàncies adhesives és potser el mètode més adequat en porcí, ja que és el més versàtil i el que més fàcilment es pot adaptar als grans volums d'ejaculat que proporciona aquesta espècie.

La filtració de dosis seminals de mascles asteroteratonecrospermics en Sephadex neutre i de dosis seminals de mascles teratospèrmics en Sephadex iònic, en llana de vidre i en glass beads resulta en un descens significatiu de la motilitat espermàtica. En canvi, no s'han observat diferències en la freqüència d'espermatozoides mòbils abans i després de la filtració en Sephadex iònic, llana de vidre i glass beads de dosis seminals de mascles astenospèrmics i astenoteratospèrmics. A la bibliografia existeix una gran controvèrsia sobre l'efecte de la filtració en diferents matrius en la motilitat espermàtica; així doncs, alguns autors descriuen un augment significatiu de la freqüència d'espermatozoides mòbils després de la filtració de dosis seminals de braus, búfals, equins, bovins i humans en columnes de Sephadex neutre i iònic, de glass beads i de llana de vidre (Fernández i Cisale., 1989; Lechztin i col., 1991; Anzar i Graham, 1993; Casey i col., 1993; Henkel i col., 1994; Larson i col., 1999; Foote, 2001; Trentalance i Beorlegui, 2002; Ahmad i col., 2003; Klinc i col., 2005), mentre que d'altres no observen canvis significatius després de la filtració en gossos (Mogas i col., 1998) i bovins (Januskauskas i col., 2005).

En porcí la valoració del moviment dels espermatozoides al microscopi òptic està sotmesa a una gran variabilitat ja que està afectada per nombrosos factors externs (Quintero-Moreno i col., 2004; Vyt i col., 2004b). De tota manera, la motilitat espermàtica està estretament relacionada amb la capacitat dels espermatozoides d'obtenir i processar energia (Roldan, 1998), així com amb la integritat de la beina mitocondrial (Nayernia i col., 2002). En aquest treball, l'activitat metabòlica dels espermatozoides s'ha valorat a partir de l'anàlisi de la producció de L-lactat (Rodríguez-Gil i col., 1996; Quintero-Moreno i col., 2004) i la integritat de la beina mitocondrial s'ha valorat en la tècnica del múltiple marcatge mitjançant el fluorocrom MitoTracker®Green FM (Bussalleu i col., 2005; Pinart i col., 2006). La filtració en les diferents reïnes de dosis seminals no altera la integritat de la beina mitocondrial ni la producció de L-lactat de mascles porcins subfèrtils. Aquests resultats suggereixen que els espermatozoides són potencialment mòbils després de la filtració, ja que el seu estat funcional i metabòlic no està afectat i que, per tant, la immobilitat observada és transitòria.

En aquest estudi només s'ha observat un increment de la freqüència d'espermatozoides amb l'acrosoma intacte després de la filtració de dosis seminals de mascles astenoteratonecrospermics en Sephadex neutre, mentre que la filtració de dosis seminals dels altres grups de mascles no ocasiona canvis en la integritat de l'acrosoma. Aquests resultats indiquen que les condicions de filtració establertes no alteren l'estabilitat de l'acrosoma ni indueixen la reacció acrosòmica, i equiparen l'eficàcia de la filtració en reïnes a altres mètodes, com la centrifugació en gradients de Percoll, que permeten eliminar els components del plasma seminal que faciliten la reacció acrosòmica (Trentalance i Beorlegui, 2002). Contràriament, la filtració de dosis seminals de braus (Chinnaya i col., 1989; Vyas i col., 1991, 1992a, 1992b), gossos (Mogas i col., 1998) i humans (Sterzik i col., 1998) en llana de vidre; de dosis seminals de gossos (Mogas i col., 1998) i humans (Drobnis i col., 1991) en Sephadex neutre; de dosis seminals de bovins (Anzar i Graham, 1995, 1996; Trentalance i Beorlegui, 2002), gossos (Mogas i col., 1998) i búfals (Ahmad i col., 2003) en Sephadex iònic i de dosis seminals de cavall en glass beads (Klinc i col., 2005) s'ha demostrat una tècnica efectiva per augmentar la freqüència d'espermatozoides amb l'acrosoma intacte.

De la mateixa manera, la filtració de dosis seminals de mascles astenoteratonecrospermics en Sephadex neutre provoca un augment de la freqüència d'espermatozoides viables i potencialment fèrtils, mentre que en els altres grups no s'observen canvis significatius abans i després de la filtració. Altres autors han descrit un augment de la vitalitat espermàtica en bovins (Cisale i col. 2001) i búfals (Goyal i col., 1996) després de la filtració en Sephadex neutre; en humans després de la filtració en llana de vidre (Coetzee i col., 1994; Nani i Jeyendran, 2001) i en gossos després de la filtració en Sephadex iònic, llana de vidre i Sephadex neutre (Mogas i col., 1998).

Aquestes divergències en els resultats de vitalitat i integritat de l'acrosoma estan probablement relacionades amb el mètode d'anàlisi emprat per valorar la funcionalitat de l'espermatozoide. En la majoria d'estudis la integritat de l'acrosoma, l'estat del nucli, l'estat de la beina mitocondrial i l'estat de la membrana plasmàtica es valoren com a paràmetres independents i, per tant, sovint apareixen sobrevalorats. En aquest treball, en canvi, es valora de forma conjunta l'estat funcional d'aquests quatre compartiments, i això fa que l'anàlisi sigui molt més restrictiva, ja que només es consideren com a viables aquells espermatozoides amb el nucli, l'acrosoma, la membrana plasmàtica i la beina mitocondrial intactes, i també molt més robusta.

En porcíns l'efecte de la filtració sobre la morfologia espermàtica de les dosis depèn de la freqüència d'espermatozoides aberrants, de manera que com major és la freqüència d'espermatozoides anormals abans de la filtració major és l'increment de la freqüència

d'espermatozoides madurs de les dosis eluïdes. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en bovins (Graham i Graham, 1990; Januskauskas i col., 2005) i humans (Hammadeh i col., 2001b) després de la filtració en columnes de Sephadex neutre; en búfals (Ahmad i col., 2003) i gossos (Mogas i col., 1998) després de la filtració en columnes de Sephadex iònic i de llana de vidre es produeix un augment de la freqüència d'espermatozoides madurs.

La resistència osmòtica dels espermatozoides en medi hipotònic (test ORT) disminueix després de la filtració en tots els grups de mascles i amb totes les reïnes emprades, mentre que la resistència en medi hipertònic (test HRT) no varia. En ovins, també s'observa una disminució de la resistència osmòtica dels espermatozoides de les dosis eluïdes en Sephadex G-10 (Valcárcel i col., 1996). Aquests resultats difereixen dels obtinguts en cavalls després de la filtració de dosis seminals en glass beads (Klinc i col., 2005); en humans (Check i col., 1993) i bovins (Cisale i col., 2001) després de la filtració de dosis en Sephadex neutre i en bovins després de la filtració de dosis seminals en Sephadex iònic (Anzar i col., 1997), en els quals la filtració es manifesta en un augment de la resistència hiposmòtica dels espermatozoides. D'altra banda, en gossos la filtració en llana de vidre no modifica aquest paràmetre (Mogas i col., 1998). En els mascles porcins el significat biològic del descens de la resistència osmòtica dels espermatozoides després de la filtració és poc clar ja que ni l'activitat metabòlica (analitzada a través de la producció de L-lactat) ni l'estat funcional de l'espermatozoide (valorada amb la tècnica de múltiple marcatge) queden alterats. Malgrat això no es pot descartar que durant la filtració es produeixin subtils canvis en les propietats físiques i bioquímiques de les membranes que no afecten la funcionalitat de l'espermatozoide, però que provoquen canvis en la permeabilitat de la membrana, i conseqüentment, en el grau amb què els electròlits poden travessar-la (Guraya, 1987).

La majoria de procediments de millora de la qualitat espermàtica com el swim-up, la separació en gradients (Somfai i col., 2003), o els procediments de gel filtració, com la filtració en glass beads (Foote, 2001), en Sephadex iònic (Anzar i Graham, 1993; Mogas i col., 1998; Trentalance i Beloregui, 2002; Ahmad i col., 2003), en Sephadex neutre (Graham i Graham, 1990; Januskauskas i col., 2005) i en llana de vidre (Engel i col., 2001) provoquen una disminució significativa de la concentració espermàtica; en alguns casos la pèrdua d'espermatozoides és tant gran que no compensa l'aplicació de mètodes de millora (Januskauskas i col., 2005). En aquest treball, s'observa també que la filtració en columnes de Sephadex neutre de dosis seminals de mascles astenoteratonecrospermics provoca un descens significatiu de la concentració espermàtica, però no així la filtració en columnes de Sephadex DEAE-50, Sephadex CM-50, llana de vidre i glass beads de dosis seminals de mascles astenospèrmics,

mascles astenoteratonecrospermics i mascles teratospèrmics. L'èxit del procés de filtració depèn en gran part de les condicions establertes per a cada tipus de columna, bàsicament l'alçada de la reïna i el flux de sortida (Cisale i col., 2001) i la temperatura de treball al laboratori (Heuer i col., 1983; Ahmad i col., 2003), les quals tenen un paper essencial en la millora de la qualitat espermàtica, més que la pròpia naturalesa de les matrius (Cisale i col., 2001).

En conclusió, les condicions establertes per a la filtració en columnes de Sephadex neutre de dosis seminals refrigerades procedents de mascles porcins subfèrtils permeten millorar la vitalitat i morfologia espermàtiques de dosis seminals amb una elevada concentració espermàtica, per bé que caldria ajustar més les condicions de filtració (variant l'alçada de la reïna i/o el flux de sortida) per evitar la pèrdua significativa d'espermatozoides després de la filtració. En canvi, les condicions de filtració establertes per les columnes de Sephadex iònic, llana de vidre i glass beads són les idònies per a la millora de la morfologia espermàtica de dosis seminals refrigerades procedents de mascles porcins subfèrtils destinades a IA.

En braus (Anzar i Graham, 1996; Januskauskas i col., 2005), búfals (Ahmad i col., 2003) i cavalls (Klinc i col., 2005) la filtració en columnes de dosis seminals de mascles fèrtils i subfèrtils prèvia congelació s'ha demostrat un mètode útil per a la millora de la qualitat de les dosis seminals. Així doncs, aquest mètode d'optimització de dosis seminals s'aplicarà a la congelació de dosis seminals de porcí per comprovar si s'obtenen els mateixos resultats que en dosis refrigerades.

Conclusions

5. CONCLUSIONS

Del disseny d'un protocol de múltiple marcatge amb fluorocroms

1. El marcatge simultani de les diferents parts de l'espermatozoide utilitzant els fluorocroms iodur de propidi/bis-benzamida per al nucli i la membrana plasmàtica, Alexa Fluor® 488-SBTI per a l'acrosoma, i MitoTracker®Green FM per a la beina mitocondrial proporciona una estimació fiable i robusta de l'estat funcional de l'espermatozoide.
2. La freqüència d'espermatozoides viables, amb el nucli, la membrana plasmàtica, l'acrosoma i la beina mitocondrial intactes, es correlaciona positivament amb la freqüència d'espermatozoides mòbils i la freqüència d'espermatozoides madurs obtinguts amb el programa informàtic SCA®Producció 2002.
3. Existeix una equivalència entre la vitalitat obtinguda amb la tècnica del múltiple marcatge i la vitalitat amb eosina-nigrosina.

De la filtració de dosis seminals de mascles reproductors Piétrain astenoteratonecrospermics en Sephadex neutre (G-25 Medium, G-50 Fine, G-50 Medium i G-75)

4. La filtració en columnes de Sephadex neutre, amb una alçada de reïna de 10 ± 0.5 cm, un flux de sortida de 1ml/20 segons i una temperatura de treball al laboratori de 23°C millora la morfologia i vitalitat espermàtiques de dosis seminals refrigerades de mascles astenoteratonecrospermics amb una elevada concentració espermàtica i elevada freqüència d'espermatozoides aberrants, per bé que provoca un descens significatiu de la concentració espermàtica i de la resistència hiposmòtica.
5. La columna més adequada per millorar la qualitat espermàtica dels mascles astenoteratonecrospermics és la de Sephadex G-50 Fine, ja que augmenta la morfologia i vitalitat espermàtiques sense alterar la freqüència d'espermatozoides mòbils.
6. És necessari ajustar les condicions de filtració de dosis seminals en Sephadex neutre per evitar el descens significatiu de la concentració espermàtica de les dosis eluïdes.

De la filtració de dosis seminals de mascles reproductors Piétrain subfèrtils en columnes de Sephadex DEAE-50, Sephadex CM-50, llana de vidre i glass beads

7. Les condicions establertes per a la filtració de dosis seminals refrigerades de mascles Piétrain subfèrtils en Sephadex DEAE-50 (2.5 ± 0.5 cm d'alçada de reïna), Sephadex CM-50 (5 ± 0.5 cm), llana de vidre (2 ± 0.5 cm) i glass beads (10 ± 0.5 cm), amb un flux de sortida

- d'1ml/40segons i una temperatura de treball al laboratori de 23°C per a tots els casos permeten millorar la morfologia espermàtica de les dosis seminals de mascles subfèrtils sense provocar un descens significatiu de la seva concentració.
8. La filtració en aquestes columnes no afecta ni a la vitalitat ni a la motilitat espermàtiques de les dosis seminals eluïdes, per bé que difereixen en el seu efecte sobre la resistència osmòtica dels espermatozoides segons el grup de mascles subfèrtils.
 9. La millor columna per a la filtració de dosis seminals de mascles astenospèrmics és la columna de glass beads ja que augmenta significativament la freqüència d'espermatozoides madurs en les dosis eluïdes.
 10. La columna més efectiva per a la filtració de dosis seminals de mascles astenoteratospèrmics és la de Sephadex CM-50, la qual provoca un augment no significatiu de la freqüència d'espermatozoides madurs sense alterar ni la resistència hiposmòtica ni l'activitat metabòlica dels espermatozoides.
 11. L'efecte de les columnes sobre la qualitat espermàtica de dosis seminals refrigerades de mascles teratospèrmics varia segons el tipus d'anomalia morfològica predominant:
 - 11.1. Els millors resultats de la filtració de dosis seminals de mascles teratospèrmics amb anomalies cefàliques i de mascles teratospèrmics amb anomalies cefàliques i a la cua s'obtenen amb les columnes de Sephadex CM-50 i glass beads, respectivament, les quals augmenten significativament la freqüència d'espermatozoides madurs sense alterar la seva resistència osmòtica.
 - 11.2. La filtració en columnes de Sephadex DEAE-50, Sephadex CM-50, llana de vidre i glass beads no provoca canvis en la qualitat espermàtica de dosis seminals refrigerades de mascles teratospèrmics amb anomalies a la cua, de manera que caldria reajustar les condicions de filtració per aconseguir millorar la qualitat espermàtica de les dosis eluïdes.
 12. És necessari reajustar les condicions de filtració en columnes de Sephadex DEAE-50, Sephadex CM-50, llana de vidre i glass beads, s'haurien a fi d'augmentar no només la freqüència d'espermatozoides madurs sinó també la freqüència d'espermatozoides viables de les dosis eluïdes.

Bibliografia

6. BIBLIOGRAFIA

- Adams, S.L.; Hessian, P.A.; Mladenov, P.V. 2003. Flow cytometric evaluation of mitochondrial function and membrane integrity of marine invertebrate sperm. *Invert. Reprod. Develop.*, 44:45-51.
- Adiga, S. i Kumar, P. 2001. Influence of swim-up method on the recovery of spermatozoa from different types of semen samples. *J Assist Reprod Genet*, 18:160-64.
- Ahmad, Z.; Anzar, M.; Shahab, M.; Ahmad, N.; Andrabi, S.M.H. 2003. Sephadex and Sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. *Theriogenology*, 59: 1189-202.
- Alghamdi, A.S.; Troedsson, M.H.; Xue, J.L.; Crabo, B.G. 2002. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *Am J Vet Res*, 63(6): 880-85.
- Anzar, M. i Graham, E.F. 1993. Filtration of bovine semen. I. Development of a Sephadex ion-exchange filter. *Anim Reprod Sci*, 31:187-95.
- Anzar, M. i Graham, E.F. 1995. Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen. *Theriogenology*, 43, 439-49.
- Anzar, M.; Graham, E.F.; Iqbal, N. 1997. Post-thaw plasma membrane integrity of bull spermatozoa separated with a Sephadex ion-exchange column. *Theriogenology.*, 47(4):845-56.
- Anzar, M. i Graham, E.F. 1996. Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen. *Theriogenology*, 45(2):513-20.
- Arts, E.G.; Kuiken, J.; Jager, S. 1994. A new method to detect acrosome-reacted spermatozoa using biotinylated soybean trypsin inhibitor. *Fertil Steril.*, 62(5):1044-55.
- Auger, J.; Leonce, S.; Jouannet, P.; Ronot, X. 1993. Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. *J Histochem Cytochem.*, 41(8):1247-51.
- Bamba, K. i Cran, D.G. 1988. Further studies on rapid dilution and warming of boar semen. *J Reprod Fertil.*, 82(2):509-18.
- Bassols, J. 2003. Estudi de les cèl·lules epitelials epididimàries de *Sus domesticus* en cultiu. Treball de recerca, Universitat de Girona.
- Bonet, S.; Briz, M.; Pinart, E.; Sancho, S.; Garcia-Gil, N.; Badia, E. 2000. Morfologia Espermàtica en Porcino. Ed. Institut d'Estudis Catalans.
- Bonet, S.; Briz, M.; Pinart, E.; Camps, R.; Fradera, A.; Casadevall, M. 1995. Light microscopy characterization of sperm morphology. *Microsc. Anal.*, 9:29-31.
- Briz, M.D. 1994. Anàlisi microscòpica de l'esperma ejaculada i de la maduració epididimària dels espermatozoides de *Sus domesticus*. Universitat de Girona
- Briz, M.D.; Bonet, S.; Pinart, E.; Camps, R. 1996. Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. *Anim. Reprod. Sci.*, 43:221-239.
- Bussalleu, E.; Pinart, E.; Yeste, M.; Briz, M.; Sancho, S.; Garcia-Gil, N.; Badia, E.; Bassols, J.; Pruneda, A.; Casas, I.; Bonet, S. 2005. Development of a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa. *Micros Res Tech*, 68(5): 277-83.
- Buxadé, C. 1984. Ganado porcino. Ed. Mundi Prensa.
- Byrd, W.; Drobnis, E.Z.; Kutteh, W.H.; Marshburn, P.; Carr, B.R. 1994. Intrauterine insemination with frozen donor sperm: a prospective randomized trial comparing three different sperm preparation techniques. *Fertil. Steril.*, 62(4):850-856.
- Cai, K.; Yang, J.; Guan, M.; Ji, W.; Li, Y.; Rens, W. 2005. Single UV excitation of Hoechst 33342 and propidium iodide for viability assessment of rhesus monkey spermatozoa using flow cytometry *Arch Androl.*, 51(5):371-83.

- Casey, P.J.; Hillman, R.B.; Robertson, K.R.; Yudin, A.I.; Liu, I.K.; Drobnis, E.Z. 1993. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J Androl.*, 14(4):289-97.
- Casey, P.J.; Robertson, K.R.; Liu, I.K.; Espinoza, S.B.; Drobnis. 1993. Column separation of motile sperm from stallion semen. *J. Androl.*, 14(2):142-148.
- Centola, G.M.; Herko, R.; Andolina, E.; Weisensel, S. 1998. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. *Fertil. Steril.*, 70(6):1173-1175.
- Check, J.H.; Zavos, P.M.; Katsoff, D.; Kiefer, D. 1993. Effects of Percoll discontinuous density gradients vs SpermPrep II vs Sephadex G-50 gel infiltration on semen parameters. *Arch Androl.*, 31(1):69-73.
- Cheng, F.P.; Fazeli, A.; Voorhout, W.F.; Marks, A.; Bevers, M.M.; Colenbrander B. 1996. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J. Androl.*, 17(6):674-682.
- Chinnaya, G.P.; Sarma, P.V. i Reddy, O. 1989. Standaritzation of semen filtration technique through different media to improve its quality. *Indian J. Anim. Sci.*, 10:56-60.
- Christensen, P.; Stryhn, H.; Hansen, C. 2005. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology.*, 63(4):992-1003.
- Cisale, H. 1999. Mejoramiento de la calidad seminal en especies de abasto. Revisión de los métodos físicos empleados sobre el semen. *Med. Vet.*, 15(9):445-453.
- Cisale, H.O.; Fischman, K.L.; Blasi, C.D.; Fernández, H.A., Gledhill, L. 2001. Enrichment of high-quality spermatozoa in bovine semen: relative effectiveness of three filtration matrices. *Andrologia*, 33:143-150.
- Claassens, O.E.; Kaskar, K.; Coetzee, K.; Lombard, C.J.; Franken, D.R. i Kruger, T.F. 1996. Comparison of motility characteristics and normal sperm morphology of human semen samples separated by percoll density gradient centrifugation. *Arch. Androl.*, 36(2):127-132.
- Coetzee, K.; Erasmus, E.L.; Kruger, T.F.; Menkveld, R.; Lombard, C.J. 1994. Glass wool filter preparation of cryopreserved spermatozoa. *Andrologia.*, 26(1):33-4.
- D'Alessandro, A.G. i Martemucci, G. 2003. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Anim Reprod Sci*, 79:93-102.
- Daya, S. i Gwatkin, R.B. 1987. Improvement in semen quality using glass bead column. *Arch Androl*, 18(3):241-4.
- Dobrinski, I.; Hughes, H.P.; Barth, A.D. 1994. Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *J. Reprod. Fertil.*, 101(3):531-538.
- Donoghue, A.M.; Garner, D.L.; Donoghue, D.J.; Johnson, L.A. 1995. Viability assessment of turkey sperm using fluorescent staining and flow cytometry. *Poult Sci.*, 74(7):1191-2000.
- Drobnis, E.Z.; Zhong, C.Q.; Overstreet, J.W. 1991. Separation of cryopreserved human semen using Sephadex™ columns, washing, or Percoll gradients. *J. Androl.*, 12:201-208.
- Ducci, M.; Gazzano, A.; Villani, C.; Cela, V.; Artini, P.G.; Martelli, F.; Genazzani, P.G. 2002. Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *Eur J Obst Gynec Reprod Biol.*, 102:53-56.
- Engel, S.; Weber, H.; Petzoldt, R.; Seidl, B.; Wiehe, W.; Sperl, J. 2001. An improved method of sperm selection by glass wool filtration. *Andrologia.*, 33(4):223-30.
- Evenson, D.P.; Parks, J.E.; Kaproth, M.T.; Jost, L.K. 1993. Rapid determination of sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *J Dairy Sci.*;76(1):86-94.
- Farlin, M.E.; Jasko, D.J., Graham, J.K.; Squires, E.L. 1992. Assessment of Pisum sativum agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 32(1):23-27.

- Fayemi, E.O.; Crabo, B.G.; Graham, E.F. 1979. Assay of frozen boar semen with Sephadex filtration. *Theriogenology*, 12(1):13-17.
- Fazeli, A.; Hage, W.J.; Cheng, F.P.; Voorhout, W.F.; Marks, A.; Bevers, M.M.; Colenbrander, B. 1997. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol. Reprod.*, 56(2):430-438.
- Fernández, H.A. i Ciasle, H. 1989. Aplicación de semen mejorado en inseminación artificial. *Vet. Arg.*, 2(58):510-517.
- Fernández, H.A. i Cisale, H. 1992. Value of improving quality of semen in artificial insemination of cattle. Communication in 12th international congress on Animal Reproduction, The Hague, The Netherlands. Congress Proceedings, Volume 1:447-449.
- Fernández, H.A.; Cisale, H.; Aisen, E.G. 1985. Mecanismo de mejoramiento de semen de bovino por filtración a través de Sephadex. *Vet. Arg.*, 2(12):144-148.
- Foote, R.H. 2001. Inhibition of sperm motility does not affect live-dead separation of bull sperm by glass beads. *Asian J Androl.*, 3:197-204.
- Fraser, L.; Gorszcsaruk, K.; Strezezek, J. 2001. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod Domest Anim.*, 36(6), 325-9.
- Garner, D.L.; Johnson, L.A.; Yue, S.T.; Roth, B.L.; Haugland, R.P. 1995. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J Androl.*, 15(6):620-9.
- Garner, D.L.; Thomas, C.A.; Allen, C.H. 1997. Effect of semen dilution on bovine sperm viability as determined by dual-DNA staining and flow cytometry. *J Androl.*, 18(3):324-31.
- Garner, D.L.; Thomas, C.A. 1999. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol Reprod Dev.*, 53(2):222-9.
- Georgiou, I.; Syrrou, M.; Stefanidis, K.; Konstantelli, M.; Lolis, D. 1998. Effect of Percoll gradient and swim-up preparation on the chromomycin A3 staining of normal and abnormal semen samples. *Andrologia.*, 30:101-104.
- Gilmore, K. i Wilson, M. 1999. The use of chloromethyl-X-rosamine (Mitotracker red) to measure loss of mitochondrial membrane potential in apoptotic cells is incompatible with cell fixation. *Cytometry.*, 36(4):355-8.
- Goyal, R.L.; Tuli, R.K.; Georgie, G.C.; Chand, D. 1996. Comparison of quality and freezability of water buffalo semen after washing or Sephadex filtration. *Theriogenology.*, 46(4):679-86.
- Graham, E.F. i Graham, J.K. 1990. The effect of whole ejaculate filtration on the morphology and fertility of bovine semen. *J. Dairy Sci.*, 73:91-97.
- Gravance, C.G.; Garner, D.L.; Baumber, J.; Ball, B.A. 2000. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology.*, 53(9):1691-703.
- Gravance, C.G.; Garner, D.L.; Miller, M.G.; Berger T. 2001. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod. Toxicol.*, 15(1):5-10.
- Guraya, S.S. 1987. Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals. SS Gruaya (ed). Berlin: Springer-Verlag, 307-335.
- Hallap, T.; Nagy, S.; Jaakma, U.; Johannisson, A.; Rodriguez-Martinez, H. 2006. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. *Theriogenology.*, 65(6):1122-36.
- Hammadeh, M.E.; Kühbner, A.; Amer, A.S.; Rosenbaum, P.; Schmidt, W. 2001a. Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. *Inter. Journ. Androl.* 24:360-368.

- Hammadeh, M.E.; Zavos, P.M.; Rosenbaum, P.; Schmidt, W. 2001b. Comparison between the quality and function of sperm after semen processing with two different methods. *Asian. J. Androl.*, 3:125-130.
- Henkel, R.R.; Franken, D.R.; Lombard, C.J.; Schill, W.B. 1994. Selective capacity of glass-wool filtration for the separation of human spermatozoa with condensed chromatin: a possible therapeutic modality for male-factor cases?. *J Assist Reprod Genet.*, 11(8):395-400.
- Heuer, C.; Tahir, N.; Crabo, B.G.; Bader, H.; Shah, M.; Saji, M. 1983. A simple method for the assay of water buffalo semen by filtration through Sephadex. *Pak. Vet. J.*, 3:157-161.
- Hoshi, K.; Katayose, H.; Yanagida, K.; Kimura, Y.; Sato, A. 1996. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril.*, 66(4):634-9.
- Huo, L.J.; Yue, K.Z.; Yang, Z.M. 2002. Characterization of viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity, capacitation status in boar sperm during in vitro storage at different ambient temperatures. *Reprod Fertil Dev.*, 14:509-514.
- Ibrahim, N.M.; Foster, D.N.; Crabo, B.G. 2001. Localization of clusterin on freeze-preserved bull spermatozoa before and after glass wool-sephadex filtration. *J. Androl.*, 22(5):891-902.
- Imade, G.E.; Towobola, O.A.; Sagay, A.S.; Otubu, J.A. 1993. Discrepancies in sperm count using improved Neubauer, Makler, and Horwells counting chambers. *Arch Androl.*, 31(1):17-22.
- Januskauskas, A.; Lukoseviciute, K.; Nagy, S.; Johannisson, A.; Rodriguez-Martinez, H. 2005. Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. *Theriogenology*, 63, 160-78.
- Jenkins, J.A. 2000. Infectious disease and quality assurance considerations for the transfer of cryopreserved fish gametes. In: T.R. Tiersch and P.M. Mazik, Editors, *Cryopreservation in Aquatic Species*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 343-363.
- Jeyendran, S.R. 2002. Sperm collection and processing methods. A practical guide. *Cambridge University Press*.
- Johnson, D.E.; Confino, E.; Jeyendran, R.S. 1996. Glass wool column filtration versus mini-Percoll gradient for processing poor quality semen samples. *Fertil Steril*, 66(3), 459-62.
- Juonala, T.; Salonen, E.; Nurttila, T.; Andersson, M. 1999. Three fluorescence methods for assessing boar sperm vitality. *Reprod Dom Anim.*, 34:83-87.
- Keij, J.F.; Bell-Prince, C.; Steinkamp, J.A. 2000. Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange, MitoFluor Green, and Mitotracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs. *Cytometry.*, 41:148.
- Khalili, M.A.; Aghaie-Maybodi, F.; Anvari, M.; Talebi, A.R. 2006. Sperm nuclear DNA in ejaculates of fertile and infertile men: correlation with semen parameters. *Urol J.*, 3(3):154-9.
- Kinger, S. i Rajalakshmi, M. 1995. Assessment of the vitality and acrosomal status of human spermatozoa using fluorescent probes. *Int J Androl.*, 18 Suppl 1:12-8.
- Klinc, P.; Kosec, M.; Majdic, G. 2005. Freezability of equine semen after glass beads column separation. *Equine Vet J.*, 37(1):43-7.
- Kumar, V. i Rani, S. 1999. Light sensitivity of the photoperiodic response system in higher vertebrates: wavelength and intensity effects. *Indian J Exp Biol.*, 37(11):1053-64.
- Kvist, U. i Björndahl, L. (editors). 2002. Manual on Basic Semen Analysis. ESHRE Monographs. Oxford University Press.
- Lacey, G. 1999. Should all images be reported? *Hosp Med.*, 60(8):544-5.
- Langlois, M.R.; Oorlynck, L.; Vandekerckhove, F.; Criel, A.; Bernard, D.; Blaton, V. 2005. Discrepancy between sperm acrosin activity and sperm morphology: significance for fertilization in vitro. *Clin Chim Acta.*, 351:121-129.
- Larson, K.L.; Brannian, J.D.; Timm, B.K.; Jost, L.K.; Evenson, D.P. 1999. Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum Reprod.*, 14(8):2015-9.

- Le Lannou, D. i Blanchard Y. 1988. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J. Reprod. Fertil.*, 84(2):551-556.
- Lechtzin, H.; Garside, W.; Heyner, S.; Hillman, N. 1991. Glass-bead column separation of motile and nonmotile human spermatozoa. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer*, 8(2):96-100.
- Levine, R.J. 1999. Seasonal variation of semen quality and fertility. *Scand J Work Environ Health.*, 25 (Suppl) 1:34-7; discussion 76-8.
- López, O.; Mata, A.; Antich, M.; Bassas, L. 1993. Sperm selection by PD-10 sephadex columns: comparison with SpermPrep filtration and Percoll centrifugation. *Hum. Reprod.*, 8(5):732-736.
- Love, C.C.; Thompson, J.A.; Brinsko, S.P.; Rigby, S.L.; Blanchard, T.L.; Lowry, V.K.; Varner, D.D. 2003. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology*, 60:1127-1138.
- Merkies, K.; Chenier, T.; Plante, C.; Buhr, M.M. 2000. Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis. *Theriogenology.*, 54(8):1215-24.
- Mogas, T.; Rigau, T.; Piedrafita, J.; Bonet, S.; Rodríguez-Gil, J.E. 1998: Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen. *Theriogenology*, 50:1171-89.
- Morrell, J.M. 2006. Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod Domest Anim*, 41(1):63-7.
- Mortimer, D. i Mortimer, S.T. 1992. Methods of sperm preparation for assisted reproduction. *Ann Acad Med Singapore.* ,21(4):517-24.
- Nagy, S.; Jansen, J.; Topper, E.K.; Gadella, B.M. 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod.*, 68(5):1828-35.
- Nani, J.M i Jeyendran, R.S. 2001. Sperm processing: glass wool column filtration. *Arch Androl.*, 47(1):15-21.
- Nayernia, K.; Adham, I.M.; Burkhardt-Göttges, E.; Neesen, J.; Rieche, M.; Wolf, S.; Sancken, U.; Kleene, K.; Engel, W. 2002. Asthenozoospermia in mice with targeted deletion of the sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein (Smcp) gene. *Mol Cell Biol.*, 22(9):3046-52.
- Nie, G.J.; Johnson, K.E.; Wenzel, J.G.W. 2003. Pregnancy outcome in mares following insemination deep in the uterine horn with low numbers of sperm selected by glass wool/Sephadex filtration, Percoll separation or absolute number. *Anim. Reprod. Sci.*, 79:103-109.
- O'Connell, M.; McClure, N.; Lewis, S.E. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod.* 17(3):704-709.
- Ohashi, K.; Saji, F.; Wakimoto, A.; Kato, M.; Tsutsui, T.; Tanizawa, O. 1992. Preparation of oligozoospermic and/or asthenozoospermic semen for intrauterine insemination using the SpermPrep semen filtration column. *Fertil. Steril.*, 57(4):866-870.
- Ozaki, T.; Takahashi, K.; Kanasaki, H.; Miyazaki, K. 2002. Evaluation of acrosome reaction and viability of human sperm with two fluorescent dyes. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 266(2):114-117.
- Paniagua-Chávez, C.G.; Jenkins, J.; Segovia, M.; Tiersch, T.R. 2006. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of fluorescent dyes. *Cryobiology.*, 53(1):128-38.
- Pinart, E.; Bussalleu, E.; Yeste, M.; Briz, M.; Sancho, S.; Garcia-Gil, N.; Bassols, J.; Pruneda, A.; Casas, I.; Bonet, S. 2006. Protocolo de triple marcaje con fluorocromos para el análisis funcional de los espermatozoides de porcino. Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino: 81-91.
- Pinart E. 1997. Efectes de la criptorquidia espontània abdominal sobre la qualitat espermàtica i l'estructura testicular dels mascles porcins postpubertals. Tesi doctoral. Universitat de Girona.

- Pinart, E.; Camps, R.; Briz, M.D.; Bonet, S.; Egozcue, J. 1998. Unilateral spontaneous abdominal cryptorchidism structural and ultrastructural study of sperm morphology. *Anim. Reprod.Sci.*, 49:247-268.
- Pinart, E.; Sancho, S.; Briz, M.D.; Bonet, S. i García, N. 1999. Characterization of the semen quality of postpuberal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side. *Anim. Reprod. Sci.*, 55:269:278.
- Poot, M.; Zhang, Y.Z.; Krämer, J.A.; Wells, K.S.; Jones, L.J.; Hanzel, D.K.; Lugade, A.G.; Singer V.L.; Haugland, R.P. 1996. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem.*, 44(12):1363-72.
- Quintero- Moreno, A.; Rigau, T.; Rodríguez-Gil, J.E. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*, 61, 673-90.
- Rawlins, S.R. 1992. Statistical software definitions to assist the student in understanding available commands. *Comput Nurs.*, 10(5):189-90.
- Report on Carcinogens. 1994: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/eleventh/profiles/s091glas.pdf>
- Rodríguez-Gil, J.E. i Rigau, T. 1995. Effect of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. *Anim Reprod Sci*, 39: 141-46.
- Rodríguez-Gil, J.E. i Rigau, T. 1996: Effects of ouabain on the response to osmotic changes in dog and boar spermatozoa. *Theriogenology*, 45, 873-88.
- Roldán, E.R.S. 1998: Signal transduction during mammalian sperm acrosomal exocytosis. In: Lauria, A.; Gandolfi, F.; Enne, G.; Gianaroli, L.; editors. Gametes: development and function. Rome: *Serono Symposia*, p.219-28.
- Rowland, S.C.; Jacobson, J.D.; Patton, W.C.; King, A.; Chan, P.J. 2003. Dual fluorescence analysis of DNA apoptosis in sperm. *Am J Obstet Gynecol.*, 188(5):1156-7.
- Samper, J.C. i Crabo, B.G. 1993. Assay of capacitated, freeze-damaged and extended stallion spermatozoa by filtration. *Theriogenology*, 39:1209-20.
- Samper, J.C.; Hamilton, D.W.; Pryor, J.L.; Loseth, H.J.; Troedsson, M.H.T.; Crabo, B.G. 1995. Mechanism of Sephadex trapping of capacitated stallion spermatozoa. *Biol Reprod Monograph*, 1:729-37.
- Sánchez, R. 1991. Control de calidad espermática. *Rev. Asoc. Nac. Porcinocult. Cient.* (Anaporc), 104:27-33.
- Sancho, S. 2002. Efectes del fotoperíode sobre la qualitat espermàtica de mascles porcins *Sus domesticus*. Tesis doctoral. Universitat de Girona.
- Schilling, E.; Vengust, M.; Bajt, G.; Tomcic, M. 1986. The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa an the relation to pregnancy rate and litter size. 9th IPVS Congress, Barcelona. p. 77.
- Segovia, M.; Jenkins, J.A.; Paniagua-Chavez, C.; Tiersch, T.R. 2000.Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology.*, 15; 53(7):1489-99.
- Shapiro, H.M. 1988. *Practical Flow Cytometry*. 2nd Ed. Alan R. Liss, Inc., New York, pp.168-169.
- Shipley, C. 1999: Breeding soundness examination in the boar. *Swine Health Prod*, pp. 117–120
- Sieme, H.; Martinsson, G.; Rauterber, H.; Walter, K.; Aurich, C.; Petzoldt, R.; Klug, E. 2003. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion sperm. *Reprod Dom Anim.*, 38:134-40.
- Soler, C.; Núñez, J.; Nuñez, M.; Sancho, M.; Gutiérrez, R. 2006. Técnicas de análisis computerizado del semen. Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino, pp. 51-68.
- Somfai, T.; Bodo, S.; Nagy, S.; Papp, A.B.; Ivancsics, J.; Baranyai, B.; Gocza, E.; Kovacs, A. 2003. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim.*, 37(5), 285-90.

- Sterzik, K.; De Santo, M.; Uhlich, S.; Gagsteiger, F.; Strehler, E. 1998. Glass wool filtration leads to a higher percentage of spermatozoa with intact acrosomes: an ultrastructural analysis. *Hum Reprod.*, 13(9):2506-11.
- Sukardi, S.; Curry, M.R.; Watson, P.F. 1997. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Anim Reprod Sci.*, 46(1-2):89-96.
- Sutovsky, P.; Ramalho-Santos, J.; Moreno, R.D.; Oko, R.; Hewitson, L.; Schatten, G. 1999. On-stage selection of single round spermatids using a vital, mitochondrion-specific fluorescent probe MitoTracker™ and high resolution differential interference contrast microscopy. *Hum. Reprod.*, 14(9):2301-2312.
- Talebi, A.R.; Khalili, M.A.; Hossaini, A. 2007. Assessment of nuclear DNA integrity of epididymal spermatozoa following experimental chronic spinal cord injury in the rat. *Int J Androl.*, 30(3):163-9.
- Tao, J.; Critser, E.S.; Critser, J.K. 1993. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. *Mol Reprod Dev.*, 36(2):183-94.
- Thomas, C.A.; Garner, D.L.; DeJarnette, J.M.; Marshall, C.E. 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 58(3):786-793.
- Tollner, T.L.; Yudin, A.I.; Cherr, G.N.; Overstreet, J.W. 2000. Soybean trypsin inhibitor as a probe for the acrosome reaction in motile cynomolgus macaque sperm. *Zygote*, 8:127-137.
- Trentalance, G.M. i Beorlegui, N.B. 2003. Sperm evaluation in cryopreserved bovine semen recovered by two selection methods. *Andrologia.*, 34(6):397-403.
- Valcárcel, A.; Heras, M.A.; Moses, D.F.; Pérez, L.J.; Baldassarre, H.; De las Heras, M.A. 1996. Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram sperm. *Anim Reprod Sci.*, 41:215-24.
- Vilagines, P.; Sarrette, B.; Champsaur, H.; Hugues, B.; Dubrou, S.; Joret, J.C.; Laveran, H.; Lesne, J.; Paquin, J.L.; Delattre, J.M.; Oger, C.; Alame, J.; Grateloup, I.; Perrollett, H.; Serceau, R.; Sinigre, F.; Vilagines, R. 1997. Round robin investigation of glass wool method for poliovirus recovery from drinking water and sea water *Water Science and Technology*, 35(11): 445-449(5).
- Vyas, S.; Dahmi, A.J.; Sahni, K.L. 1992b. Effect of filtration through Sephadex and glasswool on the quality and freezability of semen of crossbred bulls. *Indian J Anim. Sci.*, 62:341-343.
- Vyas, S.; Mohan, G.; Dahmi, A.J.; Sahni, K.L. 1991. Effect of Sephadex and glass-wool column filtration on the quality and storage (at 5°C) of crossbred bull semen. *Indian J. Anim. Sci.*, 122-133.
- Vyas, S.; Mohan, G.; Dahmi, A.J. i Sahni, K.L. 1992a. Comparative evaluation of different filtration techniques for improving the semen quality of crossbred bulls. *Indian J. Anim. Sci.*, 45:237-240..
- Vyt, P.; Maes, D.; Dejonckheere, E.; Castryck, F.; Van Soom, A. 2004a. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod Domest Anim.*, 39(1), 8-12.
- Vyt, P.; Maes, D.; Rijsselaere, T.; Dejonckheere, E.; Castryck, F.; Van Soom A. 2004b. Motility assessment of porcine spermatozoa: a comparison of methods. *Reprod Dom Anim.*, 39:447-453.
- Watson, P.F.; Kunze, E.; Cramer, P.; Hammerstedt, R.H. 1992. A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa. *J Androl.*, 13(2):131-8.
- WHO. 2000. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press..
- Windsor, D.P. 1997. Mitochondrial function and ram sperm fertility. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9(3):279-284.

- Woelders, H. 1990. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Proc. 2nd Int Conf on Boar Semen Preservation*. 145-164.
- Zini, A.; Finelli, A.; Phang, D.; Jarvi, K. 2000. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology.*, 56(6):1081-4.

