

ANIMAL

Pentoxifylline treatment of frozen pig sperm affects sperm motility and fetal numbers

Sun Young Baek¹, Hak Jae Chung¹, Joon Ki Hong¹, Eun Seok Cho¹, Inchul Choi^{2*}

¹National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Cheonan 31000, Korea

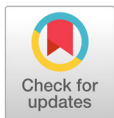
²Division of Animal and Dairy Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

*Corresponding author: icchoi@cnu.ac.kr

Abstract

The objective of this study was to investigate whether supplementation of pentoxifylline (PTX; phosphodiesterase inhibitor) to thawed boar semen improves the post-thaw motility of sperm and affects the efficiency of artificial insemination (AI) and further development. To determine the concentration of PTX for AI, frozen-thawed semen was incubated with 0, 5, 10, and 20 mM PTX in an extender freezing medium, respectively, after thawing. Kinematic properties of sperm were examined with a computer-assisted semen analysis (CASA) system. In addition, viability and mitochondrial activity were also tested by LIVE/DEAD and a MitoTracker kit. There were no significant differences in the kinetic parameters of thawed sperm between control and treatment groups, but overall assessment parameters such as motility and rapid progressive were higher in the 10 mM PTX group. In the viability and mitochondrial assay, there were no significant differences observed in the PTX treatment, compared to the control. For further analysis, artificial inseminations were performed using frozen semen and 10 mM PTX treated cryopreserved semen, respectively. There were no differences in pregnancy rates and fetus weights among the groups until 30 and 40 days, but litter size was reduced and relatively low-birth weight was observed in the PTX group. In summary, our findings suggest that enhancement of in vitro sperm quality or non-toxicity supplemented by PTX may have detrimental effects on fetus development.

Keywords: cryopreservation, motility, pentoxifylline, pregnancy, sperm



OPEN ACCESS

Citation: Baek SY, Chung HJ, Hong JK, Cho ES, Choi I. 2020. Pentoxifylline treatment of frozen pig sperm affects sperm motility and fetal numbers. Korean Journal of Agricultural Science 47:657-665. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20200053>

Received: May 12, 2020

Revised: August 10, 2020

Accepted: August 20, 2020

Copyright: © 2020 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

정자 동결은 정자의 장기간 저장과 장거리 운송이 가능해 동결 정자를 사용한 인공수정방법은 우수한 유전자원 도입과 같은 가축의 형질 개량의 목적으로 유용하게 사용되는 번식기술이다. 그러나 동결 과정 중 정자는 저온 충격 혹은 스트레스에 노출되어 정자 세포의 손상 및 정자 기능 저하를 유발한다(John Morris et al., 2012; Yeste, 2016). 정자의 동결 보존 방법이 돼지인공수정에 사용되고 있지만 동결과 용해 과정 중에 반복되어 발생하는 정자에 대한 자극은 정자의 운동성(Critser et al., 1987), 침체 온전성(Mack and Zaneveld, 1987), 생존성(Alvarez and Storey, 1993)을 저하시키는 것으로 보고되고 있다(Yeste et al., 2017). 특히, 액상 정액과 비

교해보면 동결/융해에 의한 정자 손상 때문에 동결 정액을 사용한 인공수정은 수태율과 생산된 자돈의 수가 약 10 - 20% 저하되는 것으로 알려져 있다(Bathgate et al., 2008). 이러한 단점을 해결하기 위해 유리화동결과 같은 새로운 동결 방법 개발 및 caffeine, pentoxifylline (PTX; 1-(5-oxohexyl)-3, 7-dimethylxanthine), theophylline과 같은 화학물질을 동결융해용액에 첨가하는 연구가 수행되었다(Glogowski et al., 2002; Esteves et al., 2007; Park et al., 2012; Choi et al., 2014; Yang et al., 2016; Park et al., 2017; Hong et al., 2018).

정자 기능에 관련된 Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP)의 기전은 완전하게 밝혀지지는 않았지만, 세포에서 제2의 메신저로서 광범위하게 신호전달 경로를 조절하는 중심적인 작용을 하는 cAMP는 정자에서 single atypical adenylyl cyclase (SACY)에 의해 생성되어 정자 생리에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Maréchal et al., 2017).

특히, PTX는 methylxantylne 유도체로(Bedenis et al., 2015) protein kinase A의 활성을 자극한다(Kim et al., 2016). 또한, 포스포디에스테라아제 억제제(phosphodiesterase inhibitor)로 정자의 운동성을 자극하고(Sikka et al., 1991; Tesanrik et al., 1993; Sharma et al., 1996) 정자 세포 내 cAMP의 농도를 증가시키며(Garbers et al., 1971), 동결시키기 전에 처리하면 ionophore challenge에 대한 침체 반응을 개선하여 정자의 손상을 최소화할 수 있어 인간 불임 치료제로 사용되고 있는 것으로 보고되고 있다(Esteves et al., 1998; Terriou et al., 2000; Stanic et al., 2002; Griveau et al., 2006; Kalthur et al., 2012). 동물에서는 소(Numabe et al., 2001; Barakat et al., 2015), 개(Milani et al., 2010), 말(Guasti et al., 2017; Park et al., 2018)에서 PTX는 정자의 총 운동성을 증가, 체외수정란의 발달 향상, 인공수정율 증가가 보고되었지만 돼지에서는 아직 PTX 처리된 동결 정자를 활용한 인공수정 및 산자의 생산에 관한 연구는 진행되지 않았다. 따라서 본 연구는 돼지 정자의 동결 후 융해 희석액에 PTX 처리를 통해 정자의 운동성과 생존성을 분석하고 잠재적인 독성 평가를 실시하여 현장 사용성을 제시하고자 한다.

Materials and Methods

정액 준비

본 연구에 사용된 동물들은 농촌진흥청 국립축산과학원(NIAS) 사육 기준에 따라 사료를 급여하고 자유롭게 물을 마실 수 있는 조건에서 사육되고 있는 돼지로, 동물 관리 및 절차에 관해서는 국립축산과학원 동물실험 윤리 위원회의 승인(NIAS2019-378)을 얻어 그에 준하여 실험을 수행하였다. 정액은 12 - 24 개월령의 성숙한 다섯 마리의 두록(Duroc) 수퇘지에서 수압법으로 채취하였다. 채취한 정액은 37°C로 온도를 유지하여 Beltsville Thawing Solution (BTS)로 1 : 1 (vol/vol) 희석하였다. 정장과 BTS를 제거하는 과정에서 원심 스트레스로부터 정자를 보호하기 위해 액상 쿠션(MaxiFreeze Centrifugation Cushion, IMV technologies, Rambouillet, France)을 3.5 mL 튜브 바닥에 넣고 정액을 첨가한 후 20분 동안 22°C, 1000 g 조건에서 원심 분리를 실시했다. 원심분리 후 정자를 가지고 있는 펠렛(pellet)은 글리세롤을 포함한 lactose egg-yolk (LEY), Orvus Es Paste (OEP)의 동결보호제로 희석하였다. 동결 보호제에 희석된 정자는 0.5 mL의 스트로우(straw, IMV technologies)에 정자 주입 및 밀봉 장치(MRS1 DUAL straw filling and sealing machine, IMV technologies)를 이용하여 5×10^8 마리/스트로우 농도로 주입하였으며 정액동결기(SY-LAB Gerate GmbH, Neupurkersdorf, Austria)를 이용하여 동결하였다. 동결 절차는 분당 6°C의 냉각 속도로 5°C에서 -5°C까지 냉각시킨 후 -5°C에서 60초 동안 유지시킨 후 샘플을 분당 40°C의 속도로 -5°C에서 -80°C까지 냉각한 후, 최종적으로 분당 60°C로 -80°C에서 -150°C까지 냉각하면서 동결하였다. 동결된 정자가 들어있는 스트로우 액체질소 탱크에 보관하였다.

동결융해 정자의 운동성 및 생존성 평가

동결 정자가 들어있는 0.5 mL의 스트로우는 38°C로 가온 된 순환수조에서 20초 용해 후 BTS (1 : 5 [vol/vol])에 희석하였다. 정액 샘플은 각기 다른 농도의 PTX (0, 5, 10, 20 mM)에 처리하였고 정자의 운동성은 용해 후 10분과, 40분에 CASA (computer-assisted semen analysis; ISASv1, PROISER, Paterna, Spain)를 이용하여 MOT (total motility, %), rapid progressive (%), VCL (curvilinear velocity, $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), VSL (straight-line velocity, $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), VAP (average path velocity), LIN (linearity ratio between VSL and VCL), STR (straightness ratio between VSL and VAP)등의 특성들을 측정하였다. 생존성은 LIVE/DEAD 키트(Molecular Probes, Eugene, USA)의 실험방법을 수정하여 시험했다(6반복). HEPES (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% BSA, pH 7.4)로 희석한 정액 샘플 1 mL와 5 μL SYBR 14와 5 μL propidium iodide (최종 농도 12 μM) 염색 용액을 섞고 5 - 10분 동안 처리한다. 붉은 색으로 염색되는 세포가 죽은(dead) 세포, 초록색으로 염색된 세포가 살아있는(live) 세포로 판정한다.

동결융해 정자의 미토콘드리아 막 전위와 침체 온전성

PTX로 처리된 정자의 미토콘드리아 활성은 MitoTracker™ Red CMXRos (Invitrogen, Massachusetts, USA)로 평가하였다. DMSO에 용해된 MitoTracker (1 mM) 용액을 37°C로 미리 가온하여 용해된 돼지 정자에 100 nM의 농도에서 35분 동안 처리했다. 가온한 희석액으로 세척 후 슬라이드글라스에 도말하여 형광 현미경(Olympus, BX53F, Shinjuku, Japan)으로 분석하였다.

동결 정액 인공수정

동결융해 정자의 산자 생산성 분석을 위하여 스트로우 내의 정액을 38°C의 가온 된 BTS가 들어있는 정액 주입 병 내로 흘러 들어가도록 하여 인공수정용 정액을 제조했다. 인공수정은 정액 제조 후 1시간 이내에 시행했으며, 승가를 허용한 암돼지에 24시간과 34시간에 인공수정을 2회 실시했다. 인공수정 후 30일과 40일에 각각 동결 정액 그룹 3두, PTX 처리 동결 정액 그룹 3두를 희생시켜 임신 유지와 태아 상태를 조사하였다.

통계분석

데이터는 평균 \pm 평균의 표준편차(SEM, standard error of mean)로 표현하였다. 그룹들 간의 차이는 양방향 반복 측정 ANOVA 및 R 프로그램(ver. 3.6.1. R studio, Boston, USA)을 사용하여 최하위 차이(LSD)에 의해 분석되었다. 처리 방법들 간의 차이는 Tukey HSD의 다중 범위 시험을 사용하여 결정되었다. p값이 0.05 이하일 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

Results and Discussion

본 연구의 목적은 동결된 돼지 정자를 용해/희석할 때 PTX 첨가가 정자의 운동과 생존성 및 유해성을 평가/분석하고 돼지 사육 농가의 현장 적용성을 검증하는 실험이다. 따라서, 동결 보존된 돼지 정액을 용해할 때 첨가한 PTX가 정자의 운동성 미치는 영향을 제외 실험으로 분석했으며 수태율 및 산자 수를 늘릴 수 있을지 여부를 확인하고자 체내 실험을 실시하였다. 이를 통해 PTX 첨가에 의한 정자의 운동학적 특성 변화와 수정 능력의 관계를 분석하였다.

PTX가 정자 운동성에 미치는 영향

최종 농도가 5, 10, 20 mM의 PTX가 되도록 희석액을 준비하여 동결한 돼지 정액 용해 시에 첨가한 후 10분 및 40분에 정자의 운동성을 CASA를 활용하여 분석했다(Fig. 1). MOT와 rapid progressive는 10분 경과 시 차이가 없었으나 40분 경과 시 10 mM에서 대조군보다 향상되었다($p < 0.05$). 반면에 SRT와 LIN은 10분 경과 시 5, 10 mM에서 향상되었고 20 mM 처리군에서는 운동성이 저하되었지만($p < 0.05$), 40분 경과 시 대조군과 처리군 사이에 큰 차이가 없었다($p > 0.05$). 본 운동성 시험 결과는 10 mM의 PTX 처리 시 동결 용해된 돼지 정자의 체외 운동성을 증가시킬 수 있으며 일정 수준 이상의 고농도 처리는 정자의 운동성을 저하시킬 수 있음을 제시한다. 이러한 결과는 해동 후 PTX 처리로 사람 정자의 운동성 향상을 입증한 이전의 연구와 동일하다(Hammit et al., 1989; Stanic et al., 2002). PTX는 cAMP-phosphodiesterase를 억제하여 정자 운동성을 증가시키는 영향을 주고 세포 내 cAMP의 농도를 증가시킨다. 현재 사람에서 정자의 운동성을 향상시키기 위한 기술(Banihani et al., 2018)로 남성 불임에 대한 연구와 생식기능을 향상시키기 위한 기술에 사용되고 있다(Kovacic et al., 2006; Kang et al., 2015; Terriou et al., 2015).

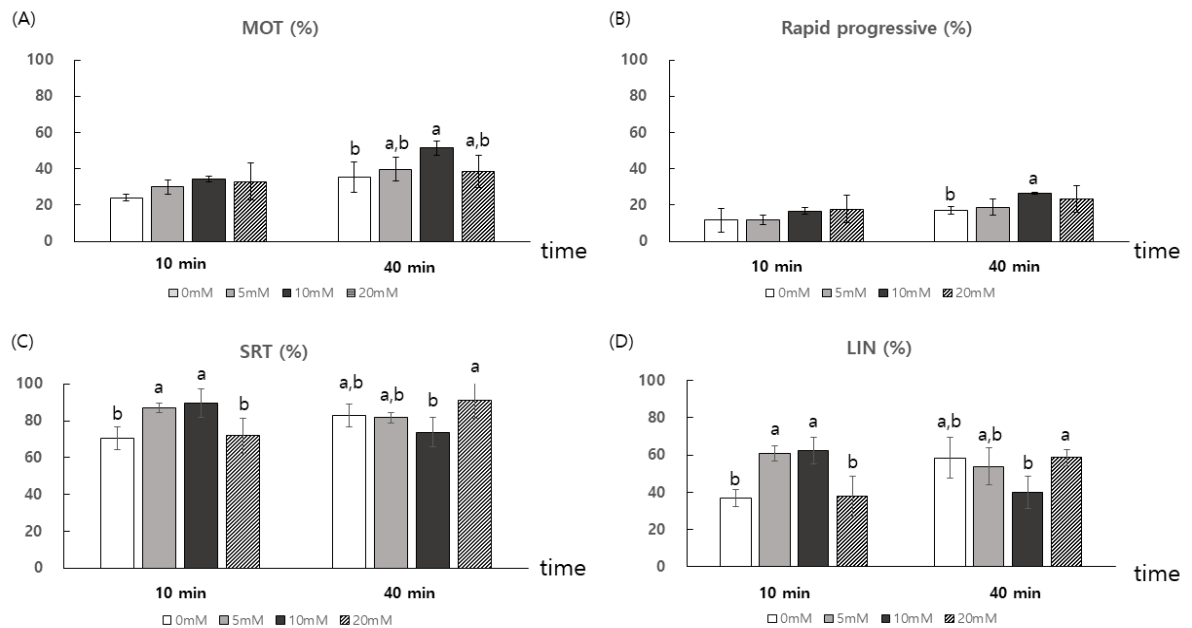


Fig. 1. Sperm motility analysis of pig sperm over time after treatment by pentoxifylline at 0, 5, 10, 20 mM. (A) MOT (%), (B) Rapid progressive (%), (C) SRT (%), (D) LIN (%). MOT, total motility; STR, straightness ratio between VSL and VAP; LIN, linearity ratio between VSL and VCL; VSL, straight-line velocity; VAP, average path velocity; VCL, curvilinear velocity. Data are averages \pm SEM ($p < 0.05$).

정자 원형질막 및 첨체 온전에 미치는 펜톡시필린의 영향

PTX는 사람 정자의 동결과정에서 생길 수 있는 반응 산소로 인한 세포막 손상을 감소시키고(Gavella et al., 1991), 정자 운동 촉진, 과활성화, 활성산소종 형성 억제 및 선구체 반응 개선의 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Lardy et al., 1971; De Jonge et al., 1991). 본 연구결과 또한 PTX 처리시 대조군과 처리군의 생존성의 차이는 없었다(Fig. 2 and Fig. 3). 또한 정자원형질막 손상 및 첨체 반응에도 대조군과 처리군 별로 유의차가 없었다($p > 0.05$). 미토콘드리아 활성도는 PTX 농도가 증가할수록 활성이 높아졌다. 따라서, PTX 처리는 돼지 정자의 생존과 정자의 형태학적 이상에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

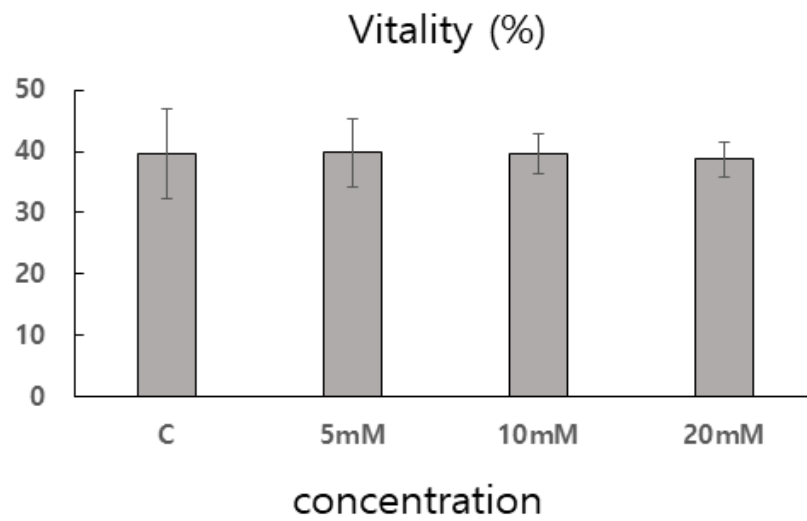


Fig. 2. Effect of sperm survival with different concentration of pentoxifylline. Vitality, live/total ratio. Data are averages \pm SEM.

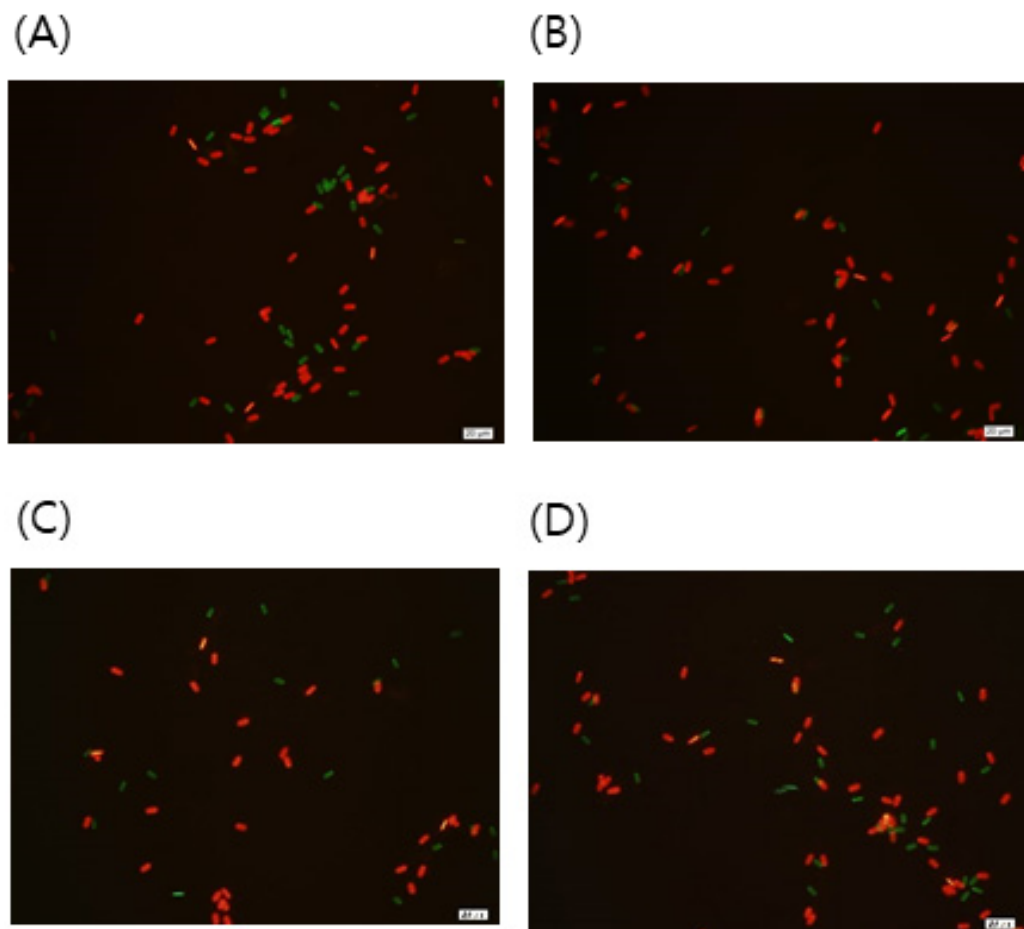


Fig. 3. Analysis of live (green) and dead (red) sperm during pentoxifylline treatment. (A) control group, (B) pentoxifylline 5 mM treatment, (C) pentoxifylline 10 mM treatment, (D) pentoxifylline 20 mM treatment. Scale bars, 20 μ m.

PTX 첨가 정자의 인공수정을 통한 수정 능력 조사

PTX 첨가가 현장 적용성을 검증하기 위해 체외실험에서 정자운동성이 향상된 10 mM PTX 처리 시 산자 생산에 어떠한 영향을 줄 것 인가를 시험하기 위해 인공수정(AI)을 하여 수태율과 태아 수, 분만율, 산자 수 등 체내에서의 정자의 수정 능력을 조사하였다. 그 결과 PTX 처리는 동결 정액 인공수정과 비교하였을 때 임신율, 임신 30일령 태아 수 및 체중, 임신 40일령 체중, 생시 체중에는 유의차가 없었다($p > 0.05$). 반면에 임신 40일령 태아 수, 분만 두수에서는 유의차가 있음을 확인하였다(Table 1) ($p < 0.05$). 이러한 결과는 PTX 처리된 정자에 의해 수정된 배아는 배아 유전자 발현과 관련하여 임신 초기 태아의 착상 유지와 관련이 있음을 시사한다.

Table 1. Number and weight of 30- and 40-day-gestation fetuses and litter size by pentoxifylline treatment of frozen and thawed swine sperm.

Group	Sows inseminated	Pregnant sows (%)	Litter size (total number, \pm SEM)			Body weight (\pm SEM, g)		
			30 days of pregnancy (n=3)	40 days of pregnancy (n=3)	Farrowing (n=3)	30 days of pregnancy (n=3)	40 days of pregnancy (n=3)	Farrowing (n=3)
Frozen semen	11	9 (81.8)	14.33 \pm 1.5	13 \pm 0a	11 \pm 1.0a	3.17 \pm 0.4	18.75 \pm 0.5	1,781.94 \pm 127.8
Eddition of 10mM pentoxifyllin	12	9 (75)	13 \pm 2.6	8.33 \pm 4.0b	8 \pm 1.0b	3.22 \pm 0.2	18.6 \pm 1.2	1,509.72 \pm 258.5

SEM, standard error of the mean.

a, b: Means in a row with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

PTX는 용해 첨가제로써 정자의 미토콘드리아 활성을 높이고, 직진성을 향상시켜 난자와 만나는 시간을 단축하고 난자에 도달하는 정자의 수를 늘린다는 면에서 정자의 품질향상에 효과가 있는 것으로 분석할 수 있다. 즉, 과활성화된 정자(hyperactivated sperm)는 운동능력이 극적으로 변화를 나타내며 정자가 난모세포에 접근하고 난자의 난구세포를 관통하는 것을 도울 수 있다(Rees et al., 1990; Cummins et al., 1991). 또한, PTX는 염증성 사이토카인의 생성을 억제하고 감소시키며 염증에 반응하여 자궁 내 면역반응 저하로 인한 임신 수준을 향상시킨다(González-Espinoza et al., 2012; Hamilçikan et al., 2017)는 연구결과가 있어 산자 수의 증가를 예상하였으나, 용해 시 정자에 PTX 처리 시 임신 30일차에서 40일차로 넘어갈 때 태아의 수가 줄어드는 것을 확인하였다. 동결된 사람 정자에서는 DNA의 단일 가닥이 파괴되고 DNA 축합 또는 단편화가 되고, 미토콘드리아 DNA의 돌연변이가 증가한다(Kopeika et al., 2015). Aurich et al. (2016)의 연구에서는 저온 충격을 받은 말 정자에서 DNA 메틸화 수준이 증가하는 것을 발견하였고, 수정 후의 낮은 생존율은 정자 DNA의 cytosine methylation에 의해 설명하고 있다. 돼지 동결 정자 세포가 난모 세포에 근접하기 전 더 이상의 에너지원이 공급되지 않는 상태에서의 정자 과활성화가 미토콘드리아 활성 증가와 함께 미토콘드리아 DNA 돌연변이, DNA 메틸화 수준의 변화와 작용하여 임신초기 태아의 유지에 영향을 줄 것이라 사료된다. 또한, 마우스 zygote에 PTX 처리는 배반포 단계의 마우스 배아의 세포 수를 감소시켰고, 이는 체외수정 전에 PTX를 처리하여 정자의 기능을 향상시킬 때, 세척 과정을 통해 PTX를 제거해야 함을 시사하고 있다(Tourmaye et al., 1993). Terriou et al. (2000)은 PTX가 정자를 자극하는지 평가하기 위해 사람의 정자에 PTX 처리 후 ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) 전에 PTX 제거를 위해 원심분리 또는 polyvinylpyrrolidone (PVP)을 통한 세척 과정을 거친 후 수정과 임신을 분석하였다. 따라서, PTX는 체외에서 정자의 운동성을 향상시키는데 영향을 미치지 않지만 돼지의 자궁 내 환경에서의 영향, 난자와 수정란의 질에 미치는 영향에 대한 추가 분석이 있어야 할 것으로 생각된다.

Conclusion

현재까지 정상적인 정자를 선택하기 위한 파라미터로 정자의 총 운동성, 농도, 형태를 검사항목으로 포함하지만 이는 수정 불가능한 정자를 판별하고 구별하는 대표적인 항목이 되기에는 부족하다. 기존의 진행되어왔던 정자 동결 및 첨가제의 효과는 총 운동성은 증가시키는 결과를 다수 보여주었다. 하지만 이런 운동성의 증가가 번식 효율을 대변하지는 않는 것으로 사료된다. 동결 정액을 이용하여 성공적인 인공수정 및 수태율을 보장하기 위해서는 총 운동성과 더불어 rapid progressive motility, LIN, STR과 같은 정자의 운동 특성이 함께 조사되어야 한다. 이에 더하여 돼지 정자의 동결 보존 프로토콜과 돼지 관리 및 사육, 적정 인공수정 타이밍의 파악에 따른 시행은 높은 수태 성적을 야기하고 생식을 촉진하는 중요한 요인이 된다. 돼지를 생산함에 있어 정자 생식 능력의 효율적 증가를 위하여 암돼지 생식에 영향을 주는 다양한 요인들과 메커니즘을 명확하게 구명해야 하며 동결융해 된 정자의 인공수정에 미치는 영향에 대하여 꾸준한 연구가 진행되어야 할 것이다.

Acknowledgements

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01201601)의 지원에 의해 수행되었습니다.

Authors Information

Sun Young Baek, <https://orcid.org/0000-0001-5130-2269>

Hak Jae Chung, <https://orcid.org/0000-0002-3127-5192>

Joon Ki Hong, <https://orcid.org/0000-0001-8272-1263>

Eun Seok Cho, <https://orcid.org/0000-0001-5223-099X>

Inchul Choi, <https://orcid.org/0000-0001-5011-2658>

References

- Alvarez JG, Storey BT. 1993. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: Glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *Journal of Andrology* 14:199-209.
- Aurich C, Schreiner B, Ille N, Alvarenga M, Scarlet D. 2016. Cytosine methylation of sperm DNA in horse semen after cryopreservation. *Theriogenology* 86:1347-1352.
- Banihani SA, Abu-Alhayjaa RF, Amarin ZO, Alzoubi KH. 2018. Pentoxifylline increases the level of nitric oxide produced by human spermatozoa. *Andrologia* 50:e12859.
- Barakat IA, Danfour MA, Galewan FA, Dkhil MA. 2015. Effect of various concentrations of caffeine, pentoxifylline, and kallikrein on hyperactivation of frozen bovine semen. *BioMed Research International* 2015:948575.
- Bathgate R, Grossfeld R, Susetio D, Ruckholdt M, Heasman K, Rath D, Evans G, Maxwell WM. 2008. Early pregnancy loss in sows after low dose, deep uterine artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed sperm. *Animal Reproduction Science* 104:440-444.
- Bedenis R, Lethaby A, Maxwell H, Acosta S, Prins MH. 2015. Antiplatelet agents for preventing thrombosis after peripheral arterial bypass surgery. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015:CD000535.

- Choi NY, Park YS, Ryu JS, Lee HJ, Araúzo-Bravo MJ, Ko K, Han DW, Schöler HR, Ko K. 2014. A novel feeder-free culture system for expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Molecules and Cells* 37:473-479.
- Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. 1987. Cryopreservation of human spermatozoa. I. Effects of holding procedure and seeding on motility, fertilizability, and acrosome reaction. *Fertility and Sterility* 47:656-663.
- Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE. 1991. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters. *Journal of Andrology* 12:98-103.
- De Jonge CJ, Han HL, Lawrie H, Mack SR, Zaneveld LJ. 1991. Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase, cyclic AMP second-messenger pathway. *Journal of Experimental Zoology* 258:113-125.
- Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. 1998. Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate. *Human Reproduction* 13:3384-3389.
- Esteves SC, Spaine DM, Cedenho AP. 2007. Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40:985-992.
- Garbers DL, Lust WD, First NL, Lardy HA. 1971. Effect of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry* 10:1825-1831.
- Gavella M, Lipovac V, Marotti T. 1991. Effect of pentoxifylline on superoxide anion production by human sperm. *International Journal of Andrology* 14:320-327.
- Glogowski J, Danforth DR, Ciereszko A. 2002. Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline. *Journal of Andrology* 23:783-792.
- González-Espinoza L, Rojas-Campos E, Medina-Pérez M, Peña-Quintero P, Gómez-Navarro B, Cueto-Manzano AM. 2012. Pentoxifylline decreases serum levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and C-reactive protein in hemodialysis patients: Results of a randomized double-blind, controlled clinical trial. *Nephrology Dialysis Transplantation* 27:2023-2028.
- Griveau JF, Lobel B, Laurent MC, Michardière L, Le Lannou D. 2006. Interest of pentoxifylline in ICSI with frozen-thawed testicular spermatozoa from patients with non-obstructive azoospermia. *Reproductive BioMedicine Online* 12:14-18.
- Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RR, Carmo MT, Dell'Aqua JA Jr, Crespilho AM, Rifai EA, Papa FO. 2017. Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science* 179:27-34.
- Hamilçikan Ş, Can E, Büke Ö, Erol M, Gayret ÖB. 2017. Pentoxifylline treatment of very low birth weight neonates with nosocomial sepsis. *American Journal of Perinatology* 34:795-800.
- Hammit DG, Bedia E, Rogers PR, Syrop CH, Donovan JF, Williamson RA. 1989. Comparison of motility stimulants for cryopreserved human semen. *Fertility and Sterility* 52:495-502.
- Hong HM, Sim GY, Park SM, Lee EJ, Kim DY. 2018. Ameliorative effect of chitosan complex on miniature pig sperm cryopreservation. *Journal of Embryo Transfer* 33:337-342. [in Korean]
- John Morris G, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. 2012. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology* 64:71-80.
- Kalthur G, Salian SR, Keyvanifard F, Sreedharan S, Thomas JS, Kumar P, Adiga SK. 2012. Supplementation of biotin to sperm preparation medium increases the motility and longevity in cryopreserved human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction Genetics* 29:631-635.
- Kang HJ, Lee SH, Park YS, Lim CK, Ko DS, Yang KM, Park DW. 2015. Artificial oocyte activation in intracytoplasmic sperm injection cycles using testicular sperm in human in vitro fertilization. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 42:45-50.
- Kim HK, Hwang SH, Lee SO, Kim SH, Abdi S. 2016. Pentoxifylline ameliorates mechanical hyperalgesia in a rat model of chemotherapy-induced neuropathic pain. *Pain Physician* 19:E589-600.
- Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. 2015. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: Principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update* 21:209-227.

- Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M. 2006. Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia. *Journal of Andrology* 27:45-52.
- Lardy HA, Garbers DL, Lust WD, First NL. 1971. Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry* 10:1825-1831.
- Mack SR, Zaneveld LJ. 1987. Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa. *Gamete Research* 18:375-383.
- Maréchal L, Guillemette C, Goupil S, Blondin P, Leclerc P, Richard FJ. 2017. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in human spermatozoa and seminal fluid: Presence of an active PDE10A in human spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects* 1861:147-156.
- Milani C, Fontbonne A, Sellem E, Stelletta C, Gérard O, Romagnoli S. 2010. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. *Theriogenology* 74:153-164.
- Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T, Horuchi T. 2001. Pentoxifylline improves *in vitro* fertilization and subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology* 56:225-233.
- Park SH, Jeon Y, Yu IJ. 2017. Effects of antioxidants supplement in porcine sperm freezing on *in vitro* fertilization and the glutathione and reactive oxygen species level of presumptive sygotes. *Journal of Embryo Transfer* 32:337-342. [in Korean]
- Park SH, Shin SM, Yang BC, Kim NY, Woo JH, Shin MC, Yoo JH, Son JK. 2018. Effect of pentoxifylline concentration on sperm quality in Jeju crossbred horses. *Journal of Embryo Transfer* 33:17-22. [in Korean]
- Park SK, Yoon J, Wang L, Shibata TK, Motamedchaboki K, Shim KJ, Chang MS, Lee SH, Tamura N, Hatakeyama S, Nadano D, Sugihara K, Fukuda MN. 2012. Enhancement of mouse sperm motility by trophinin-binding peptide. *Reproductive Biology and Endocrinology* 10:101.
- Rees JM, Ford WC, Hull MG. 1990. Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 90:147-156.
- Sharma RK, Tolentino MV Jr, Thomas AJ Jr, Agarwal A. 1996. Optimal dose and duration of exposure to artificial stimulants in cryopreserved human spermatozoa. *Journal of Urology* 155:568-573.
- Sikka SC, Hellstrom WJ. 1991. The application of pentoxifylline in the stimulation of sperm motion in men undergoing electroejaculation. *Journal of Andrology* 12:165-170.
- Stanic P, Sonicki Z, Suchanek E. 2002. Effect of pentoxifylline on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *International Journal of Andrology* 25:186-190.
- Terriou P, Hans E, Cortvrindt R, Avon C, Charles O, Salzmänn J, Lazdunski P, Giorgetti C. 2015. Papaverine as a replacement for pentoxifylline to select thawed testicular or epididymal spermatozoa before ICSI. *Gynecol Obstet Fertility* 43:786-790.
- Terriou P, Hans E, Giorgetti C, Spach JL, Salzmänn J, Urrutia V, Roulier R. 2000. Pentoxifylline initiates motility in spontaneously immotile epididymal and testicular spermatozoa and allows normal fertilization, pregnancy, and birth after intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction Genetics* 17:194-199.
- Tesanrik J, Mendoza C. 1993. Sperm treatment with pentoxifylline improves the fertilizing ability in patients with acrosome reaction insufficiency. *Fertility and Sterility* 60:141-144.
- Tournaye H, Van der Linden M, Van den Abbeel E, Devroey P, Van Steirteghem A. 1993. Effects of pentoxifylline on in-vitro development of preimplantation mouse embryos. *Human Reproduction* 8:1475-1480.
- Yang CH, Wu TW, Cheng FP, Wang JH, Wu JT. 2016. Effects of different cryoprotectants and freezing methods on post-thaw boar semen quality. *Reproductive Biology* 16:41-46.
- Yeste M. 2016. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 85:47-64.
- Yeste M, Rodríguez-Gil JE, Bonet S. 2017. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Molecular Reproduction and Development* 84:802-813.