

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto de técnicas de separación espermática en la viabilidad y estado acrosomal de espermatozoides posdescongelados de ovinos

José Ernesto Hernández Pichardo^I, José Luís Rodríguez Suástegui^I, Cecilia Sánchez Martínez^{II}, Rafael Ramírez Franco^{II}

^ILaboratorio Manejo de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán 04960. México, D.F. Correo electrónico: ehernan@correo.xoc.uam.mx.

^{II}Clínica privada. México, D.F.

RESUMEN: Se evaluó la efectividad de cuatro técnicas de separación espermática en semen descongelado de ovino. Se utilizaron 160 pajillas de 0.5 ml, con una concentración de 200×10^6 /ml. En cada sesión de trabajo se descongelaron 4 pajillas a 37.5°C por 45 segundos, y se mezcló el contenido de ellas. Se tomaron 200 µl para realizar cada una de las siguientes técnicas: *swim-up*, Percoll, filtración a través de fibra de vidrio y filtración por Sephadex. La movilidad progresiva de los espermatozoides se incrementó en las pruebas obtenidas mediante *swim-up*, fibra de vidrio y Sephadex (56.1%, 66.4% y 56.8%, respectivamente), con diferencia significativa ($p < 0.05$). Los espermatozoides vivos con reacción acrosomal se incrementaron en todas las técnicas de separación espermática, con una diferencia significativa ($p < 0.05$) en los obtenidos con *swim-up*, fibra de vidrio y Sephadex, cuyos valores fueron superiores al 50.0%. Los espermatozoides muertos, con y sin reacción acrosomal, disminuyeron en todas las técnicas con excepción de los obtenidos mediante Percoll, en el que se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) con relación al control, con excepción de los obtenidos mediante *swim-up* y Sephadex al evaluar los muertos con reacción acrosomal. Al evaluar los espermatozoides vivos sin RA, se encontró una disminución de este indicador en todos los tratamientos (13.1, 9.1, 9.3 y 10.8%, *swim-up*, Percoll, fibra de vidrio y Sephadex, respectivamente). La viabilidad espermática evaluada con la prueba hipoosmótica y Ioduro de propidio, determinaron que se obtienen un mayor porcentaje de espermatozoides vivos cuando son filtrados con fibra de vidrio (73.0% y 68.3%, prueba hipoosmótica e Ioduro de propidio, respectivamente); no se observa diferencia significativa ($p > 0.05$) entre estas dos últimas pruebas.

Palabras clave: *swim-up*, técnicas de separación espermática, espermatozoides ovinos.

Effect of sperm separation techniques on the viability and acrosome reaction of frozen-thawed ovine spermatozoids

ABSTRACT: The effectiveness of four sperm separation techniques on thawed ovine semen was evaluated. A hundred and sixty straws with 0.5 ml of semen with a concentration of 200×10^6 /ml were used. In each work session, four straws were thawed at 37.5°C for 45 sec mixing their contents. Then, 200 µl were taken to perform one of the following techniques: Swim-up, Percoll, filtering through glass fiber or filtering through Sephadex. Increased progressive motility of spermatozoids was obtained through swim-up, glass fiber and Sephadex (56.1%, 66.4%, and 56.8%, respectively), which was significantly different ($p < 0.05$) in those recovered from glass fiber. The numbers of live spermatozoids with acrosome reaction were high with all the separation techniques, with a significant difference ($p < 0.05$) in those obtained from swim-up, glass fiber and Sephadex, whose values were higher than 50.0%. The numbers of dead spermatozoids, with and without acrosome reaction, were low in all the techniques, with the exception of those obtained by Percoll, which was significantly different ($p < 0.05$) to the control, excepting those obtained by Sephadex and swim-up when the dead ones with acrosome reaction were evaluated. When evaluating live spermatozoids without acrosome reaction, a low value of this indicator was found in all the treatments (13.1, 9.1, 9.3 and 10.8%, swim-up, Percoll, glass fiber and Sephadex, respectively). The sperm viability evaluated with the hypo-osmotic test and propidium iodide concluded that a higher percentage of live spermatozoids were obtained when they were filtered with glass fiber (73.0% and 68.3%, hypo-osmotic test and propidium iodide, respectively); no significant differences ($p < 0.05$) were observed between these two last test.

Key words: swim-up, sperm separation techniques, ovine spermatozoids.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida como inseminación artificial, fecundación *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), ofrecen claras ventajas en el mejoramiento genético, reducción de enfermedad y producción económica de alimentos de origen animal (1). En muchos de los casos, estas técnicas se llevan a cabo con semen descongelado, pero se sabe que la mayoría de los espermatozoides se dañan durante el proceso de congelación y descongelación. Dicho proceso es perjudicial para las membranas de los espermatozoides, pues afecta su organización, fluidez, permeabilidad y composición lipídica, lo que ocasiona bajos porcentajes de movilidad y daños en las estructuras membranales, por lo tanto, una corta vida en el tracto genital de la hembra y bajo porcentaje de fertilidad, ejerciendo los espermatozoides muertos un efecto tóxico y lítico (1). Por lo que es necesario, una vez realizada la descongelación, separar los espermatozoides móviles de los no móviles, remover el plasma seminal, los crioprotectores, agentes infecciosos y desechos celulares (2). Existen cuatro métodos básicos para separar espermatozoides móviles y viables: 1: dilución y lavado mediante centrifugación y resuspensión de los espermatozoides; 2: migración espermática como el procedimiento de *swim-up*; 3: lavado selectivo de subpoblaciones a través de centrifugación de gradientes de densidad, ejemplo Percoll; 4: empleo de sustancias adhesivas para eliminar espermatozoides muertos, como la filtración con fibra de vidrio o Sephadex (3).

En la especie humana es donde más se han trabajado las técnicas de separación espermática en semen fresco, para incrementar la movilidad, viabilidad y morfología normal de los espermatozoides (4, 5) y eliminar espermatozoides con daño en su ADN (6, 7). En algunas especies de interés productivo se utilizan estas técnicas para mejorar la calidad espermática; así por ejemplo, tenemos que en ganado bovino se han aplicado en semen criopreservado, para separar espermatozoides de buena calidad (8, 9) y usarlos en la producción de embriones *in vitro* (1, 2, 10); también para separar espermatozoides con cromosoma X (11). En equinos se han utilizado para obtener una mejor calidad seminal en semen refrigerado y semen congelado-descongelado (3), y en porcinos para recuperar espermatozoides de buena calidad, a partir de cerdos subfértiles (12). En caprinos se ha usado en semen descongelado para comparar el Percoll con un gradiente específico de la especie (13), y en ovinos se

han aplicado en semen fresco (14). Existen pocos datos concernientes a la efectividad de los métodos de separación espermática en semen descongelado de ovino. Por lo que el objetivo de este estudio fue la evaluación espermática de semen descongelado de ovino, antes y después de ser sujeto a una de las siguientes técnicas de separación espermática: *swim-up*, Percoll y filtración a través de fibra de vidrio o Sephadex.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 160 pajillas de 0.5 ml de semen descongelado de ovino, con una concentración de 200×10^6 /ml, obtenidos de sementales criollos, de 4 a 5 años de edad, con una dieta equilibrada y agua *ad libitum*, con fertilidad probada. En cada sesión de trabajo se descongelaron 4 pajillas a 37.5°C por 45 segundos, mezclándose el contenido de ellas; dicha suspensión se evaluó y se consideró como control. Posteriormente, se tomaron 200 µl para realizar cada una de las técnicas, las cuales se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar para mantener condiciones de esterilidad.

El medio que se usó para realizar las técnicas de filtración y migración espermática fue Fluido Tubárico Humano (HTF) (15).

Preparación de la técnica de *swim-up*

Para realizar la migración espermática mediante la técnica de *swim-up*, se colocaron 200 µl de muestra de semen en un tubo de vidrio, previamente atemperado a 37.5°C al que se le adicionaron 1000 µl de medio HTF. El tubo se inclinó 45° y se incubó a 37.5°C durante una hora. De la parte superior se recuperaron 200 µl para su evaluación (16).

Columna de gradiente de densidad de Percoll

Para preparar esta columna se utilizó una solución de Percoll al 90% (10 ml de medio HTF, 90 ml de Percoll®, SIGMA P1644, 29 mg de CaCl_2 , 8 mg de MgCl_2 , 109 mg de NaHCO_3) (8). Para preparar el gradiente de densidad de 45%, se tomaron 250 µl de Percoll al 90% y 250 µl de medio HTF. En el fondo de un tubo eppendorf estéril de 2 ml se colocaron 500 µl del gradiente de mayor densidad; posteriormente se colocaron en la parte superior 500 µl del gradiente de menor densidad, teniendo cuidado de no mezclar ambos gradientes, y por último se depositaron 200 µl de la mezcla de semen. Dicha columna se centrifugó a 200 gravedades durante 10 minutos (Eppendorf, Centrifuge 5702). El pellet recuperado del fondo del tubo se diluyó en 200 µl de medio HTF, para evaluarse inmediatamente (10).

Columna de filtración con Sephadex

Se preparó, 24 horas antes de su uso, una suspensión de Sephadex G-15 (Sigma, GE17-0020) al 20% en 1500 µl de medio HTF en jeringuillas desechables de 10 ml. Antes del filtrado del semen se pasó a través del Sephadex 1 ml de medio HTF a 37.5 °C. Posteriormente se colocaron 200 µl de semen en la columna, y se adicionó 1 ml de medio HTF. La muestra filtrada se recuperó en un tubo de ensayo con una temperatura de 37.5°C (3).

Columna de filtración de fibra de vidrio

Se colocaron 0.125 g de fibra de vidrio (Sigma, 18421) en una pipeta Pasteur. Se lavó dos veces con 1 ml de medio HTF a 37.5°C para atemperar la fibra, eliminar fibras de vidrio sueltas, así como otras partículas. El filtrado fue el mismo procedimiento que se describió para Sephadex (17).

Evaluación de los espermatozoides

Los parámetros espermáticos evaluados fueron: movilidad progresiva, estado acrosomal y viabilidad.

Para evaluar la movilidad progresiva de los espermatozoides se colocaron 10 µl de semen sobre un portaobjeto, cubierto con un cubreobjeto, para ser observados en un microscopio de contraste de fase (Nikon, ECLIPSE TE 200) a 400X con termoplatina (18).

La viabilidad se evaluó mediante la prueba hipoosmótica (HOST) y la prueba de loduro de propidio (IP). En la prueba HOST se usó una solución de citrato de sodio (4.9 g/l) y fructosa (9.0 g/l). Se añadieron 10 µl de muestra de semen en 100 µl de solución hipoosmótica y se incubó por 30 minutos a 37.5°C (1). Los espermatozoides fueron clasificados como vivos si presentaban algún grado de hinchazón de su flagelo, que nos indica integridad y habilidad de la membrana espermática para transportar fluidos y muertos si presentaban su flagelo recto (5).

Para determinar el estado funcional de los espermatozoides (100 µl de cada muestra procesada), se utilizó la doble tinción de Isotiocianato de fluoresceína con Peanut aglutinina (FITC-PNA) (Sigma, L7381) e IP (Sigma P4170) (19,20). A 10 µl de esta suspensión se le adicionaron 10 µl de glutaraldehído y se les realizó el frotis, que se observó con un microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse E600) a 400 aumentos. La tinción con FIT-PNA se evaluó con un filtro B-2A (rango de excitación azul, con un filtro de excitación de 450-490 nm), mientras que la tinción con IP se evaluó con un filtro G-2A (rango de excitación verde con un filtro de excitación 510-560 nm) (1).

El estado funcional de los espermatozoides se evaluó y clasificó de acuerdo a los siguientes patrones de tinción:

- Espermatozoides vivos con acrosoma intacto: células espermáticas con tinción de FITC-PNA a nivel acrosomal, sin tinción de IP a nivel postacrosomal.
- Espermatozoides vivos con RA: células espermáticas sin tinción acrosomal (FITC-PNA) y sin tinción IP.
- Espermatozoides muertos con acrosoma intacto: células espermáticas con tinción de FITC-PNA a nivel acrosomal, y con tinción nuclear (IP).
- Espermatozoides muertos con RA: células espermáticas sin tinción acrosomal (FITC-PNA) y con tinción nuclear (IP).

Se contaron 100 espermatozoides por frotis.

Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas entre las características espermáticas, antes y después de los tratamientos, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis del programa NCSS versión 10 (21).

RESULTADOS

En la movilidad progresiva de los espermatozoides obtenidos mediante *swim-up*, fibra de vidrio y Sephadex, se encontró un incremento (56.1%, 66.4% y 56.8%, respectivamente) con respecto a la muestra control (43.1%), mientras que en los obtenidos a través de Percoll este parámetro disminuyó (30.5%), con diferencia significativa ($p < 0.05$) en todos los tratamientos.

En el porcentaje de espermatozoides vivos con reacción acrosomal (RA) se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en las muestras obtenidas con *swim-up*, fibra de vidrio y Sephadex. Los valores son superiores al 50.0%, sin diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la muestra control y lo recuperado con Percoll (35.6% y 41.2%, respectivamente).

En el análisis de los espermatozoides muertos, con y sin RA, se observó una disminución en los espermatozoides tratados, con relación a la muestra control, excepto los obtenidos mediante Percoll, donde se incrementan los espermatozoides muertos con RA (30.4% vs 41.4), con una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre todos los valores, con excepción de los muertos con RA en las muestras obtenidas con *swim-up* y Sephadex.

Al evaluar los espermatozoides vivos sin RA, se encontró una disminución después del tratamiento con

swim-up, Percoll, fibra de vidrio y Sephadex (13.1%, 9.1%, 9.3% y 10.8%, respectivamente) con respecto a la muestra control (18.2%), con una diferencia significativa ($p < 0.05$) (Tabla 1).

En la Tabla 2, se encuentran los datos de viabilidad espermática evaluada con la técnica HOST e IP antes y después de los tratamientos de separación espermática. Se observa un incremento de espermatozoides vivos después del tratamiento en *swim-up* (60.1-64.7%), fibra de vidrio (73.0-68.3%) y Sephadex (62.9-64.2%), con relación a la muestra control (52.9-53.8%), mientras que disminuyeron los espermatozoides vivos en la muestra tratada con Percoll (43.5-50.3%).

Los espermatozoides obtenidos por filtración de fibra de vidrio tuvieron el porcentaje más alto de espermatozoides vivos, en los dos métodos de evaluación (73.0% y 68.3%, HOST e IP, respectivamente), con una diferencia significativa ($p < 0.05$) de todos los tratamientos, con relación al control en la prueba HOST. Esta diferencia significativa solo se observó en las muestras obtenidas en el tratamiento con fibra de vidrio en la prueba de IP. No se encontró diferencia signi-

ficativa ($p > 0.05$) al evaluar la viabilidad espermática por medio de HOST ó IP.

DISCUSIÓN

La movilidad progresiva de los espermatozoides es un requisito esencial para llevar a cabo la fertilización (1, 9). Las técnicas de *swim-up* y filtrado con fibra de vidrio y Sephadex incrementaron el número de espermatozoides con movilidad progresiva de semen de ovino pos-descongelado, lo que coincide con reportes previos (2), donde trabajando con semen pos-descongelado de toro se determinó un incremento de espermatozoides con movilidad progresiva después de haberlos procesado en *swim-up*, o filtrados en fibra de vidrio o Sephadex (1).

Con la técnica de Percoll se redujo el número de espermatozoides con movilidad progresiva (30.5%), mientras que otros investigadores que han trabajado con semen pos-descongelado de toro reportan un incremento de 70.8% (1) y de 83.0% (9). Resulta importante considerar que con la técnica de Percoll se trabaja con diferentes gravedades de centrifugación y di-

TABLA 1. Promedio de las características de semen pos-descongelado de ovino, después de ser sometido a diferentes técnicas de separación espermática./ *Average characteristics of post-thawed ovine semen after subjected to several spermatic separation techniques.*

n	Control	<i>Swim-up</i>	Percoll	Fibra vidrio	Sephadex
	4000	4000	4000	4000	4000
% MP±DE	43.1±6.2 ^a	56.1±11.3 ^b	30.5±9.6 ^b	66.4±7.5 ^b	56.8±12.7 ^b
% VRA± DE	35.6±15.7 ^a	51.7±10.6 ^b	41.2±12.0 ^a	59.0±12.4 ^b	53.5±15.9 ^b
% MRA± DE	30.4±8.1 ^a	26.6±9.7 ^a	41.4±14.0 ^b	23.8±8.2 ^b	28.3±12.9 ^a
% VSRA± DE	18.2±9.2 ^a	13.1±9.0 ^b	9.1±7.9 ^b	9.3±5.7 ^b	10.8±8.0 ^b
% MSRA± DE	15.8±9.5 ^a	8.7±5.5 ^b	7.5±5.4 ^b	7.8±6.4 ^b	7.5±6.0 ^b

^{a-b}=Valores con diferente letra en la misma línea tienen diferencia significativa ($P < 0.05$).

n= número de espermatozoides evaluados. MP= Motilidad progresiva. VRA= Vivos con reacción acrosomal.

MRA= Muertos con reacción acrosomal. VSRA= Vivos sin reacción acrosomal.

MSRA= Muertos sin reacción acrosomal. DE= Desviación estándar.

TABLA 2. Porcentaje de viabilidad espermática en semen de ovino descongelado, determinado mediante la prueba hipoosmótica (HOST) y Ioduro de propidio (IP) antes y después de ser sometidos a diferentes técnicas de separación espermática./ *Percentage of spermatic viability in thawed ovine semen determined by the hypo-osmotic test (HOST) and propidium iodide (IP) before and after being subjected to several spermatic separation techniques.*

	Control	<i>Swim-up</i>	Percoll	Fibra vidrio	Sephadex
Prueba HOST	52.9±11.7 ^a	60.1±13.0 ^b	43.5±17.4 ^b	73.0±10.0 ^b	62.9±13.6 ^b
Prueba IP	53.8±12.5 ^a	64.7±11.7 ^a	50.3±14.1 ^a	68.3±10.7 ^b	64.2±14.8 ^a

^{a,b} Valores con diferente letra en la misma línea tienen diferencia significativa ($p < 0.05$).

No se observó diferencia significativa entre valores de la misma columna ($p > 0.05$).

ferentes tiempos. En esta investigación se utilizó 200 g por 10 minutos, mientras que Hae-Lee *et al.* (1) utilizaron 300 g por 20 minutos, y Trentalance y Beorlegui, (9) emplearon 900 g por 10 minutos. También es importante tener en cuenta la cantidad de Percoll que se usa de cada uno de los gradientes. En el presente estudio se adicionó 500 µl de cada gradiente, mientras que los anteriores autores (1, 9) utilizaron 1.5 ml y 2.0 ml, respectivamente. Aunado a lo anterior, varios autores (3, 4, 13) concluyen que la centrifugación de los espermatozoides tiene un efecto detrimental en la calidad espermática.

La viabilidad espermática y estado acrosomal evaluados con la doble tinción de FITC-PNA y IP, determinó un incremento en el porcentaje de espermatozoides vivos con RA en todas las técnicas de separación espermática (51.7% a 59.0%). Lo anterior concuerda con lo encontrado por Lucio *et al.* (11), quienes trabajando con una tinción vital de Azul Tripán/Giemsa en semen descongelado de toro, encontraron un incremento de espermatozoides vivos con RA después de haberlos sometido a la técnica de *swim-up* (59.2%) y gradientes de Percoll (71.8%) con relación a la muestra control (52.0%). Varios autores (11, 13) reportan que los procedimientos de selección espermática inducen la RA.

Con relación a los espermatozoides muertos con RA, solo se observó un incremento en las muestras sujetas a Percoll, contrario a lo encontrado por otros investigadores (8, 11) quienes reportan una disminución de este parámetro (20.0% y 5.9%, respectivamente) con relación al control (32.3% y 35.6%).

En el porcentaje de espermatozoides vivos sin RA, se determinó una disminución, después de los tratamientos, con un rango de 9.1% a 13.1%. Lucio *et al.* (11) reportan, con la técnica de *swim-up* 9.7% y con Percoll 7.0%, realizando la evaluación con tinción vital de Azul Tripán/Giemsa en semen descongelado de toro. Es muy importante considerar esta característica, ya que solo los espermatozoides vivos con acrosoma intacto tienen la posibilidad de fertilizar al ovocito, con excepción del uso de ICSI, donde se pueden usar espermatozoides que han sufrido su reacción acrosomal, requiriéndose además un número mínimo de espermatozoides, en función del número de ovocitos disponibles para la inyección.

Los espermatozoides muertos sin RA disminuyeron a menos del 9% después de los tratamientos; esta misma tendencia la encontraron Lucio *et al.* (11), quienes teniendo un valor de 6.3%, disminuyó a 3.2% después del *swim-up* y a 1.6% en Percoll.

En esta investigación se evaluó la viabilidad espermática por medio de la prueba de HOST y de IP, siendo en la prueba de fibra de vidrio donde se obtuvo el mayor porcentaje de viabilidad con ambos métodos de evaluación (73.0% con HOST, 68.3% con IP). Lo anterior confirma lo reportado por Hae-Lee *et al.* (1), quienes usando una prueba de fluorescencia y la de HOST, determinaron que la fibra de vidrio es el método más eficiente para recuperar espermatozoides vivos en semen descongelado de bovino (87.0% y 75.5%, fluorescencia y HOST, respectivamente), en comparación con las técnicas de Sephadex (66.9% y 54.0%) y Percoll (74.9% y 58.3%, respectivamente).

Bajo las condiciones de esta investigación, el mejor método para recuperar espermatozoides con mayor movilidad y viabilidad de semen posdescongelado de ovino es a través de la filtración en fibra de vidrio, y la evaluación de la viabilidad espermática se puede realizar con la prueba HOST o la prueba IP, ya que sus valores son similares.

REFERENCIAS

1. Hae-Lee L, Sue-Hee K, Dong-Beom J, Yong-Jun KA. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. *J Vet Sci.* 2009;10(3):249-255.
2. Samardzija M, Karadjole M, Getz I, Makek Z, Cergolj M, Dobranic T. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:58.
3. Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzoldt R, et al. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reprod Dom Anim.* 2003;38:134-140.
4. Sills ES, Wittkowski KM, Tucker MJ, Perloe M, Kaplan CR, Palermo GD. Comparison of centrifugation- and noncentrifugation-based techniques for recovery of motile human sperm in assisted reproduction. *Arch Androl.* 2002;48:141-145.
5. Wang FN, Suh BY. Revision of hypo-osmotic swelling (HOS) test with a proposition of classified grading system: its comparisons with four different types of human sperm separation technique. *Arch Androl.* 2005;51:317-326.

6. Jayaraman V, Upadhya D, Narayan PK, Adiga SK. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29:557-563.
7. Sauer R, Coulam CB, Jeyendran RS. Chromatin intact human sperm recovery is higher following glass wool column filtration as compared with density gradient centrifugation. *Andrologia.* 2012;44:248-251.
8. Somfai T, Bodo S, Nagy S, Papp AB, Iváncsics J, Baranyai B, et al. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Dom Anim.* 2002;37:285-290.
9. Trentalance GM, Beorlegui NB. Sperm evaluation in cryopreserved bovine semen recovered by two selection methods. *Andrologia.* 2002;34:397-403.
10. Wolf CA, Brass KE, Rubin MIB, Pozzobon SE, Mozzaquatro FD, De La Corte FD. The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos. *Anim Reprod.* 2008;5(3/4):110-115.
11. Lucio AC, Resende MV, Dernowseck-Meirelles JA, Perini AP, Oliveira LZ, Miguel MCV, et al. Assessment of swim-up and discontinuous density gradient in sperm sex preselection for bovine embryo production. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2012;64(3):525-532.
12. Bussalleu E, Pinart E, Rivera MM, Arias X, Briz M, Sancho S, et al. Effects of filtration of semen doses from subfertile boars through neuter Sephadex columns. *Reprod Dom Anim.* 2008;43:48-52.
13. Batista AM, Silva SV, Soares AT, Monteiro Jr PLJ, Wischral A, Guerra MMP. Comparison of CapriPure and Percoll density gradients for sperm separation of frozen-thawed goat spermatozoa. *Anim Reprod.* 2011;8(3/4):81-84.
14. Martí E, Pérez R, Muino-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. *J. Androl.* 2006;27(6):746-753.
15. Romanato M. Papel del heparan sulfato en el proceso de descondensación de la cromatina del espermatozoide humano. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas Naturales-Universidad de Buenos Aires. Argentina. 2012.
16. Morrell JM, Rodríguez HM. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *Open Androl J.* 2009;1:1-9.
17. Engel S, Weber H, Petzoldt R, Seidl B, Wiehe W, Sperl J. An improved method of sperm selection by glass wool filtration. *Androl.* 2001;33:223-230.
18. Cabrera VP, Ayulo LA, Pantoja AC. Efecto del dilutor Tris y Citrato con yema de huevo de codorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. *Rev Inv Vet.* 2011;22(2):105-113.
19. Ortgies F, Klewitz J, Görgens A, Martinsson G, Sieme H. Effect of procaine, pentoxifylline and trolox on capacitation and hyperactivation of stallion spermatozoa. *Andrologia.* 2012;44:130-138.
20. Varesi S, Vernocchi V, Faustini M, Luvoni GC. Morphological and acrosomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit. *Acta Vet Scand.* 2013;55:17.
21. Machado GM, Carvalho JO, Siqueira FE, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, et al. Effect of percoll volumen, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology.* 2009;71(8): 1289-1297.

Recibido: 18-9-2014.
Aceptado: 22-1-2015.