

Eficaz selección de espermatozoides bovinos criopreservados usando filtración por columnas de lana de vidrio

Vazquez-Levin, M. H. ⁽¹⁾, Marín Briggiler, C. I. ⁽¹⁾, Cetica, P. ⁽²⁾, Dalvit, G. ⁽²⁾, Caballero, J. N. ^(1,2) y Arzondo, M. M. ^(1,2)

Resumen

La criopreservación del semen es ampliamente utilizada en el manejo reproductivo bovino y permite la distribución y comercialización del material genético de esta especie. Sin embargo, los protocolos de congelación/descongelación afectan negativamente la calidad espermática, originando una alta proporción (más del 50%) de espermatozoides muertos y criocapacitados, no aptos para la fecundación. Para obtener espermatozoides funcionales es necesario realizar procedimientos de selección espermática. Recientemente hemos publicado un trabajo en la revista *Theriogenology* (2012; 78:201-209) que describe el uso de la filtración por columnas de lana de vidrio para la selección de espermatozoides funcionales a partir de semen bovino previamente congelado. El método es rápido, sencillo y económico, y permite seleccionar un alto porcentaje de espermatozoides vivos ($94 \pm 3\%$), con motilidad progresiva ($89 \pm 4\%$), no capacitados ($80 \pm 10\%$), con el acrosoma intacto ($98 \pm 1\%$) y que presentan alta capacidad de fecundar ovocitos *in vitro*. La técnica de filtración permite obtener un rendimiento del $67 \pm 19\%$, ~4 veces mayor que el del método de *Swim up*. En conclusión, la filtración por columnas de lana de vidrio es una alternativa válida para las biotecnologías reproductivas bovinas, así como para otros animales domésticos y de granja y para especies en peligro de extinción.

Palabras clave: semen bovino; criopreservación; selección espermática; filtración por columnas de lana de vidrio; *swim up*.

Efficient cryopreserved bovine sperm selection using glass wool filtration

Summary

Frozen bull semen is worldwide distributed and utilized in several assisted reproductive technologies. However, semen cryopreservation negatively affects sperm quality, rendering a high proportion (over 50%) of dead and cryocapacitated spermatozoa with low fertilizing potential. To obtain a population of functional spermatozoa, a selection procedure must be applied. Our group recently reported in the

(1) Instituto de Biología y Medicinal Experimental (IBYME), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) - Universidad de Buenos Aires. Calle Vuelta de Obligado 2490. Laboratorios B16 & B24. Código Postal: C1428ADN. Buenos Aires, Argentina. E-mail: mhvazl@gmail.com

(2) Cátedra de Química Biológica, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad de Buenos Aires.

Recibido: 10 de octubre de 2012.

Aceptado: 9 de noviembre de 2012.

Taurus Año 14 Nº 56: 24-31

Theriogenology journal (2012; 78:201-209) a comprehensive study that demonstrates the effectiveness of the glass wool filtration procedure to select functional spermatozoa from frozen-thawed semen samples in a fast, low-cost and simple fashion. High percentages of live spermatozoa ($94\pm3\%$), with progressive motility ($89\pm4\%$), mainly non-capacitated ($80\pm10\%$), with intact acrosomes ($98\pm1\%$), and capable to fertilize oocytes in vitro were recovered in the filtrate. The glass wool sperm filtration procedure rendered a yield of $67\pm19\%$, ~ 4 times higher than the Swim up.

In conclusion, sperm filtration through glass wool columns is a valid alternative to be incorporated in the bull reproductive technologies, and may be suitable for other domestic and farm animals as well as to endangered species.

Key words: bovine sperm; cryopreservation; sperm selection; glass wool filtration; swim up.

-
1. Manejo del semen bovino. Criopreservación.
 2. Técnicas de selección espermática.
 3. Filtración por columnas de lana de vidrio.
 4. Filtración por columnas de lana de vidrio para la selección de semen bovino criopreservado.
 5. Conclusiones.
 6. Bibliografía.
-

1. Manejo del semen bovino. Criopreservación

El uso del semen congelado es una práctica ampliamente difundida en el manejo reproductivo de la especie *Bos taurus* y el conocimiento en esta área ha adquirido una importancia considerable en los últimos 30 años ⁽¹³⁾. Sin embargo, los protocolos disponibles para la congelación-descongelación del semen afectan negativamente la calidad seminal y el potencial fecundante de los espermatozoides ⁽⁴⁷⁾. Para que ocurra la fecundación, los espermatozoides deben poder llegar a la ampolla oviductal, penetrar el *cumulus oophorus* y la *zona pellucida* (ZP) que rodean al ovocito, fusionarse con la membrana plasmática de la gameta femenina y descondensar su núcleo dentro del citoplasma ovocitario. Para esto, es necesario que los espermatozoides eyaculados sufran numerosos cambios, conocidos en conjunto como capacitación espermática, que desarrollen un patrón característico de motilidad (hiperactivación) y que se produzca la exocitosis acrosomal (EA) con la consecuente liberación de las enzimas acrosomales ⁽⁴⁸⁾. Los cambios asociados con la capacitación y la EA deben darse en las cercanías del ovocito y su ocurrencia temprana es nociva para la funcionalidad de

la gameta masculina. Se ha reportado que la congelación-descongelación de los espermatozoides produce cambios similares a la capacitación, fenómeno conocido como “criocapacitación” ⁽⁹⁾.

Los espermatozoides sometidos a técnicas de congelación presentan cambios estructurales ^(21,23), alteraciones en antígenos de superficie ⁽¹⁹⁾, modificaciones en vías de señalización y en las concentraciones iónicas intracelulares ^(3,33). Estos cambios llevan a una pérdida de la motilidad, así como a una disminución en la viabilidad y en la capacidad fecundante de las muestras criopreservadas en comparación con las de semen fresco ^(47,2). Resultados de nuestro grupo de investigación ⁽¹⁾, en concordancia con los de otros autores ⁽³³⁾ han mostrado que, luego de la criopreservación, las muestras de semen bovino presentan alrededor de 23% de espermatozoides muertos, 65% de espermatozoides móviles y 54% de espermatozoides criocapacitados (patrón B de acuerdo a la técnica de clortetraciclina o CTC).

2. Técnicas de selección espermática

Dado que la presencia de espermatozoides inmóviles o dañados en las muestras de semen crio-

preservado puede afectar negativamente la capacidad fecundante espermática, es necesario que los espermatozoides móviles y morfológicamente normales sean recuperados de forma rápida y eficiente cuando estas muestras necesiten ser usadas para protocolos de reproducción asistida.

Específicamente en el caso del bovino, a igual número de espermatozoides móviles inseminados, se han obtenido tasas de preñez mayores con espermatozoides seleccionados respecto de los correspondientes a muestras no seleccionadas ⁽²⁰⁾.

Con el fin de seleccionar los espermatozoides funcionales y separarlos de los demás tipos celulares presentes en una muestra de semen, se han desarrollado diversas técnicas basadas en diferentes principios. Entre éstas, las más tradicionales son el Swim up, la centrifugación en gradientes de densidad y los procedimientos de filtración. Actualmente también se cuenta con técnicas de selección "avanzadas", que separan espermatozoides de acuerdo a su carga de superficie, apoptosis, madurez de membrana y morfología a alta magnificación ⁽³⁶⁾. En especies de interés zootécnico, en particular en el bovino, la selección basada los cromosomas sexuales tiene una gran importancia comercial, si bien el empleo de la citometría de flujo no ha alcanzado las expectativas iniciales ⁽²²⁾.

La técnica de separación ideal debe 1) ser rápida, fácil y económica, 2) permitir aislar la mayor cantidad posible de espermatozoides móviles, 3) evitar causar daño o alteraciones no fisiológicas a los espermatozoides seleccionados, 4) eliminar los espermatozoides muertos y otros tipos celulares, incluyendo microorganismos, 5) eliminar diluyentes de criopreservación, agentes decapacitantes, especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species), plasma seminal, etc. y 6) permitir procesar grandes volúmenes de eyaculado. La elección de un método de selección dado debe realizarse considerando las características del eyaculado (volumen, motilidad y concentración espermática), si fue criopreservado o no, así como el uso posterior de la muestra (inseminación intrauterina, fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática (ICSI)).

En el procedimiento de Swim up se seleccionan aquellos espermatozoides capaces de desplazarse desde la fase inferior del semen hacia la fase superior conteniendo medio de cultivo, luego de un período de incubación de hasta 1 h. Esta técnica

relativamente sencilla y económica posee bajo rendimiento (10%-20%), aunque el mismo puede ser mejorado por el agregado de ciertas sustancias que estimulan la motilidad espermática ⁽¹⁵⁾. Tanto el Swim up, el aislamiento con centrifugación en gradientes de Percoll TM y la filtración con columnas de intercambio iónico de Sephadex TM han sido ampliamente usadas para seleccionar espermatozoides móviles a partir de semen bovino criopreservado, para inseminación artificial y procedimientos de FIV ^(27,28,41,44). En estas muestras también se ha reportado el mejoramiento en el rendimiento cuando se agrega ácido hialurónico o cafeína a los medios de cultivo como mejoradores de la calidad espermática ^(10,35,40).

3. Filtración por columnas de lana de vidrio

La filtración por columnas de lana de vidrio es un procedimiento que separa los espermatozoides muertos de los vivos por su diferente adherencia al vidrio y permite seleccionar a aquellos espermatozoides móviles que pueden moverse por sí solos a través de las fibras de lana de vidrio ⁽¹⁵⁾. La técnica de filtración por columnas de lana de vidrio ha sido utilizada para la selección de espermatozoides humanos ^(31,42,46), equinos ^(7,39) y, más recientemente, espermatozoides porcinos ⁽⁶⁾ y caninos ⁽¹⁷⁾.

Los estudios en estas especies, en particular en el humano, demostraron que la filtración por lana de vidrio permite obtener mayor porcentaje de espermatozoides vivos y móviles ^(8,14,46), con mayor madurez nuclear ⁽³⁷⁾, mejor calidad de ADN y cromatina ^(24,38) y mayor capacidad fecundante ⁽³⁸⁾ que con otras técnicas de separación. Además, los espermatozoides humanos separados por filtración por columnas de lana de vidrio han sido utilizados exitosamente para protocolos de inseminación artificial ⁽¹⁶⁾, FIV ⁽⁴⁶⁾ e ICSI ⁽⁴⁵⁾. Sin embargo, hasta el presente, la selección espermática mediante filtración por columnas de lana de vidrio no ha sido utilizada de manera extensiva en la especie bovina.

4. Filtración por columnas de lana de vidrio para la selección de semen bovino criopreservado

Evidencias de dos estudios revelan que el uso de las columnas de lana de vidrio para la selección de espermatozoides bovinos criopreservados permite aumentar la proporción de espermatozoides móviles

de la muestra de 43% a 62% ⁽³²⁾, que es una técnica más eficiente que otras en la separación de espermatozoides con su membrana intacta y que da lugar a embriones con mayores tasas de clivaje *in vitro* ⁽¹⁸⁾.

Un estudio de nuestro grupo de investigación publicado este año en la revista internacional *Theriogenology* ⁽¹⁾, describe un conjunto de experiencias enfocadas a caracterizar la efectividad del método de filtración por columnas de lana de vidrio para recuperar espermatozoides funcionales a partir de semen bovino previamente congelado. Además de la evaluación de los parámetros espermáticos de rutina (vitalidad, motilidad y vigor) ⁽⁵⁾ de los espermatozoides seleccionados luego de la filtración, se determinó su capacidad fecundante, a través del análisis de la ocurrencia de capacitación espermática, su respuesta a estímulos farmacológicos y fisiológicos de la EA y su capacidad de fecundar ovocitos *in vitro*. Asimismo, el estudio incluyó una serie de evaluaciones para comparar la eficacia del procedimiento de filtración en columnas respecto de la técnica del Swim up.

Para la realización de este trabajo se utilizaron

muestras de semen de toros Holando Argentino de probada fertilidad, las que fueron criopreservadas en buffer Tris suplementado con glicerol y yema de huevo, usando procedimientos estándar. Las mismas fueron descongeladas en un baño de agua a 36°C por 60 seg, diluidas 10 mL de medio para espermatozoides Sp-TALP ⁽³⁰⁾, y sometidas a una centrifugación de 5 min a 350 xg para eliminar el diluyente de criopreservación. Para la selección espermática se utilizaron columnas conteniendo 10 mg de lana de vidrio (Manville Fiber Glass Corp; Denver, CO, EEUU) (Figura 1). Luego de la descongelación, las muestras de semen (15-25 x 10⁶ espermatozoides por pajuela) fueron diluidas con un volumen igual de Sp-TALP y colocadas sobre columnas de lana de vidrio previamente lavadas con medio. Luego del agregado de medio, el filtrado fue recolectado en un tubo limpio durante 1 min. El filtrado fue suplementado con medio y sujeto a centrifugación (350 xg, 5 min) para remover los restos de plasma seminal y del diluyente de criopreservación; el "pellet" de espermatozoides seleccionados por filtración fue resuspendido en 0,5 mL del mismo medio.

Figura 1. Columnas de lana de vidrio utilizadas para la selección de espermatozoides bovinos previamente criopreservados. Se muestran las columnas de lana de vidrio y la manera en que se manipulan, colocándolas sobre un tubo de 15 mL, donde es recogido el eluido.



www.centrocaba.com.ar

CABA

- Comercialización de semen
- Congelación de semen a terceros
- Evaluación de semen de reproductores
- Comercialización de embriones congelados
- Transferencias embrionarias
- Alojamiento de hembras donantes

Le ofrecemos seriamente la mejor genética

Juan Martín Narbaltz M.V.
Laprida 1184 (6430) Carhué - Bs. As. - Argentina - Email: narbaltzjm@invertel.com.ar
Tel: (02936) 430110 Fax: (02936) 430321 Cel: (02923) 15641743

Sobre los espermatozoides seleccionados se evaluaron parámetros espermáticos de rutina (viabilidad, motilidad, vigor), así como funcionales (capacitación mediante CTC ⁽¹¹⁾ y estado acrosomal mediante la técnica de tinción con la lectina de *Pisum sativum* acoplada a FITC ⁽¹²⁾).

A fin de comparar la eficiencia de la filtración en columnas de lana de vidrio con la del procedimiento de Swim up, una alícuota de la muestra de semen descongelado fue ubicada en la base de un tubo cónico, cubierta por el doble de volumen de medio Sp-TALP e incubada a 39°C, en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire por 30 min. Finalizado ese tiempo, se tomaron los 200 µL superiores del medio de cultivo y la muestra fue sometida a centrifugación y fue analizada como la seleccionada por lana de vidrio. Para ambas técnicas se determinó el rendimiento, a través del cálculo de la siguiente fórmula:

Concentración espermática (x 10⁶/mL) x espermatozoides con motilidad progresiva (%) x volumen (mL) obtenidos después de la selección / Concentración espermática (x 10⁶/mL) x espermatozoides con motilidad progresiva (%) x Volumen (mL) usado para el procedimiento de selección.

La Tabla 1 muestra los valores de los parámetros de rutina y funcionales correspondientes a los espermatozoides seleccionados luego de la filtración a través de lana de vidrio, en comparación con los del Swim up, así como el rendimiento de ambos procedimientos. Los espermatozoides recuperados por lana de vidrio presentaron porcentajes de viabilidad, motilidad progresiva y vigor significativamente mayores (P<0,05) que los seleccionados por Swim up. Además, con la técnica de filtración se obtuvieron mayores porcentajes de espermatozoides no capacitados (patrón F de CTC) y con acrosoma intacto, así como mayor rendimiento (P<0,05). Cabe destacar que con la filtración por lana de vidrio se obtuvo un rendimiento casi 4 veces mayor que con el Swim up.

La comparación entre muestras no seleccionadas y muestras seleccionadas indica que la filtración por lana de vidrio conduce a un mejoramiento en los parámetros espermáticos (espermatozoides vivos: 77% versus 94%; espermatozoides con motilidad progresiva: 65% versus 89%; espermatozoides no capacitados: 42% versus 80% en muestras no seleccionadas versus filtradas, respectivamente).

Tabla 1. Parámetros espermáticos de muestras de semen bovino criopreservado sometidas a filtración por columnas de lana de vidrio o Swim up y el rendimiento obtenido para ambas técnicas de selección. Los resultados se expresan como promedio ± desvío estándar; n = 16 muestras (al menos 2 muestras de 6 toros).

Parámetros espermáticos		Lana de vidrio	Swim up
Espermatozoides vivos (%)		94 ± 3 ^a	88 ± 6 ^b
Espermatozoides móviles progresivos (%)		89 ± 4 ^a	77 ± 9 ^b
Vigor		4 ± 1 ^a	4 ± 0 ^b
Ensayo de CTC	No capacitados (Patrón F, %)	80 ± 10 ^a	59 ± 16 ^b
	Capcitados (Patrón B, %)	20 ± 10 ^a	38 ± 14 ^b
	Reaccionados (Patrón AR, %)	1 ± 1 ^a	3 ± 4 ^b
PSA-FITC Espermatozoides intactos (%)		98 ± 1 ^a	95 ± 2 ^b
Rendimiento		67 ± 19 ^a	18 ± 8 ^b

a, b Los superíndices diferentes indican diferencias (P<0,05) entre los procedimientos (ANOVA y Test de Bonferroni).

En nuestro trabajo también se evaluó la competencia funcional de los espermatozoides filtrados a través de lana de vidrio. Para esto, los espermatozoides fueron incubados con heparina (60 µg/mL) en medio Sp-TALP durante 45 min a 39°C, en una atmósfera de CO₂ 5 % en aire ⁽²⁶⁾ para promover la capacitación. Como control, una alícuota además fue suplementada con glucosa 5 mM (heparina+glucosa) ⁽²⁹⁾ y otra alícuota fue incubada en ausencia de heparina (sin heparina), condiciones en que no ocurre la capacitación. En la Tabla 2 se muestran los resultados, observándose que las alícuotas incubadas con heparina presentaron alrededor de 50% de espermatozoides capacitados (patrón B de CTC) en comparación con un 16% de espermatozoides capacitados en los controles (P<0,05); por lo tanto, las células recuperadas luego de la filtración a través de lana de vidrio pueden capacitarse cuando son incubadas en las condiciones adecuadas.

Para analizar la capacidad de los espermatozoides seleccionados de sufrir la EA, los mismos fueron expuestos durante 15 min a: 1) agentes farmacológicos: lisofosfatidilcolina (LPC) 100 µg/mL o ionóforo de calcio A23187 3 µM (Io) ⁽⁴⁾ ó 2) un agente fisiológico: fluido folicular bovino (FF) al 30% ⁽³⁴⁾. Los resultados revelaron que estos espermatozoides fueron capaces de liberar el contenido acrosomal en respuesta a estos estímulos (Tabla 3).

Tabla 2. Parámetros espermáticos en espermatozoides seleccionados por lana de vidrio en condiciones capacitantes con heparina (heparina), con el agregado de glucosa (heparina + glucosa) o en ausencia de heparina (sin heparina). Los resultados se expresan como media $\pm$ desvío estándar; n = 21 muestras (de al menos 4 muestras de 5 toros).

Parámetros espermáticos		Heparina	Heparina + Glucosa	Sin Heparina
Espermatozoides vivos (%)		73 $\pm$ 5 ^a	76 $\pm$ 6 ^a	76 $\pm$ 5 ^a
Ensayo de CTC	No capacitados (Patrón F, %)	45 $\pm$ 5 ^a	80 $\pm$ 4 ^b	79 $\pm$ 5 ^b
	Capcitados (Patrón B, %)	50 $\pm$ 5 ^a	16 $\pm$ 2 ^b	17 $\pm$ 4 ^b
	Reaccionados (Patrón AR, %)	4 $\pm$ 1 ^a	4 $\pm$ 1 ^a	4 $\pm$ 2 ^a

a, b Los superíndices diferentes indican diferencias ($P < 0,05$) entre los tratamientos (ANOVA y Test de Bonferroni).

Tabla 3. Exocitosis acrosomal en espermatozoides bovinos criopreservados sometidos a filtración por columnas de lana de vidrio. Los espermatozoides móviles fueron incubados en condiciones capacitantes, divididos en dos alícuotas y expuestos por 15 min a lisofosfatidilcolina (LPC) 100 μ g/mL, a ionóforo de calcio A23187 (Io) o a fluido folicular bovino (FF) al 30 %. Como control, otra alícuota fue incubada en ausencia de inductor. Se registró el porcentaje de espermatozoides reaccionados usando la técnica de PSA-FITC. Los resultados se expresan como media $\pm$ desvío estándar; n = 5 muestras (1 muestra de 5 toros).

Tratamiento	Espermatozoides reaccionados (%)
Sin LPC	19 $\pm$ 8 ^a
Con LPC	48 $\pm$ 14 ^b
Sin Io	13 $\pm$ 2 ^a
Con Io	41 $\pm$ 5 ^b
Sin FF	19 $\pm$ 1 ^a
Con FF	35 $\pm$ 2 ^b

a, b Los superíndices diferentes indican diferencias ($P < 0,05$) entre los valores obtenidos en presencia o ausencia del inductor (prueba t de Student).

Finalmente, los espermatozoides seleccionados por filtración a través de lana de vidrio fueron utilizados para inseminar ovocitos bovinos maduros completos (complejos ovocito-cumulus, COCs) o desprovistos de las células del *cumulus oophorus* ⁽⁴³⁾. El 72 $\pm$ 4% de los COCs y el 52 $\pm$ 6% de los ovocitos desnudos dieron embriones de 2 células (n = 150 COCs y n = 144 ovocitos desnudos, 5 ensayos). Estos resultados confirman la capacidad fecundante de los espermatozoides recuperados en el filtrado de la columnas de lana de vidrio, siendo los valores obtenidos similares a los publicados utili-

zando espermatozoides seleccionados por Swim up ⁽²⁸⁾.

En conjunto, los resultados de nuestro estudio demostraron que la filtración en columnas de lana de vidrio es un método altamente eficaz para recuperar espermatozoides bovinos móviles, no capacitados, con acrosoma intacto y funcionales, a partir de muestras de semen criopreservadas. Esta técnica requiere de menos de 5 min de procesamiento, tiempo total considerablemente menor que el necesario para otras técnicas de selección, en particular el Swim up, que requiere de hasta 1 h de incubación, lapso que podría resultar en una capacitación espermática prematura.

5. Conclusiones

El uso de la criopreservación en el semen bovino hace necesaria la optimización de técnicas de selección espermática que permitan eliminar los espermatozoides criocapitados y mantener la funcionalidad espermática. La filtración por columnas de lana de vidrio es una técnica rápida, simple, de bajo costo y eficiente que permite aislar espermatozoides bovinos de muestras criopreservadas. Dicha técnica puede ser beneficiosa para mejorar la concepción *in vivo* luego de la inseminación artificial, así como la fecundación *in vitro* en el bovino. Asimismo, este método puede ser aplicado para la selección espermática en otras especies de granja y domésticas ^(6,7,17), así como para animales en peligro de extinción ⁽²⁵⁾.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la revista Theriogenology, por autorizar la difusión de los resultados publicados en el artículo en el nro. 1 del volumen 78 del año 2012. Asimismo, al Dr. R. Mazzeo y colaboradores, del Centro de Inseminación Artificial CIAVT (Venado Tuerto, Santa Fe, Argentina), por proveer muestras de semen bovino criopreservadas para nuestros estudios, a la empresa Manville Fiber Glass Corp. (Denver, CO, EEUU) por donarnos la lana de vidrio y al IBYME y el INITRA donde se ha realizado el presente trabajo. Nuestro trabajo ha sido financiado por la Organización Mundial de la Salud (Subsidio # 97175), la Agencia Nacional de Promoción Científica Tecnológica (ANPCyT) [PICT2004 5-26110] y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) [PIP # 2120], Investigador Responsable: MHVL.

6. Bibliografía

- Arzondo, M.M., Caballero, J.N., Marín-Briggiler, C.I., Dalvit, G., Cetica, P.D. and Vazquez-Levin, M.H. 2012. Glass wool filtration of bull cryopreserved semen: a rapid and effective method to obtain a high percentage of functional sperm. *Theriogenology* 78:201-209.
- Bailey, J.L., Bilodeau, J.F. and Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* 21:1-7.
- Bailey, J.L., Buhf, M.M. 1994. Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci* 74:45-51.
- Beorlegui, N., Cetica, P., Trinchero, G., Córdoba, M. and Beconi, M. 1997. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. *Andrologia* 29:37-42.
- Bishop, M.N.H., Campbell, R.C., Hancock, J.L. and Walton, H. 1954. Semen characteristics and fertility in the bull. *J. Agric. Sci* 44:227.
- Bussalleu, E., Pinart, E., Rivera, M.M., Briz, M., Sancho, S., Yeste, M., Casas, I., Fàbrega, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E. and Bonet, S. 2009. Effects of matrix filtration of low-quality boar semen doses on sperm quality. *Reprod. Domest. Anim.* 44:499-503.
- Casey, P.J., Robertson, K.R., Liu, I.K., Espinoza, S.B. and Drobnis, E.Z. 1993. Column separation of motile sperm from stallion semen. *J Androl* 14:142-148.
- Coetzee, K., Erasmus, E.L., Kruger, T.F., Menkveld, R. and Lombard, C.J. 1994. Glass wool filter preparation of cryopreserved spermatozoa. *Andrologia* 26:33-34.
- Cormier, N. and Bailey, J.L. 2003. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 69:177-185.
- Correa, J.R. and Zavos, P.M. 1996. Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenology* 46:1225-1232.
- Fraser, L.R., Abeydeera, L.R. and Niwa, K. 1995. Ca(2+)-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 40:233-241.
- Galantino-Homer, H.L., Visconti, P.E. and Kopf, G.S. 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.* 56:707-719.
- Galli, C. and Lazzari, G. 2008. The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reprod. Domest. Anim.* 43 Suppl 2: 1-7.
- Henkel, R.R., Franken, D.R., Lombard, C.J. and 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.* 11:395-400.
- Henkel, R.R. and Schill, W.B. 2003. Sperm preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:108.
- Jeyendran, R.S., Perez-Pelaez, M. and Crabo, B.G. 1986. Concentration of viable spermatozoa for artificial insemination. *Fertil. Steril.* 45:132-134.
- Kim, S.H., Yu, D.H. and Kim, Y.J. 2010. Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Anim. Reprod. Sci* 119:106-114.
- Lee, H.L., Kim, S.H., Ji, D.B. and Kim, Y.J. 2009. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. *J. Vet. Sci* 10:249-255.
- Lessard, C., Parent, S., Leclerc, P., Bailey, J.L. and Sullivan, R. 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J. Androl.* 21:700-707.
- Maki-Laurila, M. and Graham, E.F. 1968. Separation of dead and live spermatozoa in bovine semen. *J. Dairy Sci* 51:965.
- Martínez, C.O., Juárez-Mosqueda, M. de L., Hernández, J. and Valencia, J. 2006. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology* 66:1969-1975.
- Morrell, J.M. and Rodríguez-Martínez, H. 2010. Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Vet. Med. Int.* Aug 4;2011. pii: 894767.
- Nagy, S., Hallap, T., Johannisson, A. and Rodríguez-Martínez, H. 2004. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci* 80:225-235.
- Nani, J.M. and Jeyendran, R.S. 2001. Sperm processing: glass wool column filtration. *Arch. Androl.* 47:15-21.
- O'Brien, J.K. and Roth, T.L. 2000. Post-coital sperm recovery and cryopreservation in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*) and application to gamete rescue in the African black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *J. Reprod. Fertil.* 118:263-271.
- O'Flaherty, C., Rodríguez, P. and Srivastava, S. 2004. L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta* 1674:215-221.

27. Parrish, J.J. and Foote, R.H. 1987. Quantification of bovine sperm separation by a swim-up method. Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *J. Androl.* 8:259-266.
28. Parrish, J.J., Krogenaes, A. and Susko-Parrish, J.L. 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44:859-869.
29. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L. and First, N.L. 1989. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol. Reprod.* 41:683-699.
30. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A. and First, N.L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38:1171-1180.
31. Paulson, J.D. and Polakoski, K.L. 1977. A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. *Fertil. Steril.* 28:178-181.
32. Pereira, R.J., Tuli, R.K., Wallenhorst, S. and Holtz, W. 2000. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology* 54:185-192.
33. Pons-Rejraji, H., Bailey, J.L. and Leclerc, P. 2009. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reprod. Fertil. Dev.* 21:525-537.
34. Rodriguez, P.C. and Beconi, M.T. 2009. Peroxynitrite participates in mechanisms involved in capacitation of cryopreserved cattle. *Animal Reprod. Sci* 110:96-107.
35. Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B. and Pertoft, H. 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod. Fertil. Dev.* 9:297-308.
36. Said, T.M. and Land, J.A. 2011. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* 17:719-733.
37. Sánchez, R., Villagrán, E., Risopatrón, J. and Célis, R. 1994. Evaluation of nuclear maturity in human spermatozoa obtained by sperm-preparation methods. *Andrologia* 26:173-176.
38. Sauer, R., Coulam, C.B. and Jeyendran, R.S. 2012. Chromatin intact human sperm recovery is higher following glass wool column filtration as compared with density gradient centrifugation. *Andrologia* 44 Suppl 1:248-251.
39. Sieme, H., Martinsson, G., Rauterberg, H., Walter, K., Aurich, C., Petzoldt, R. and Klug, E. 2003. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reprod. Domest. Anim.* 38:134-140.
40. Shamsuddin, M., Rodriguez-Martinez, H. and Larsson, B. 1993. Fertilizing capacity of bovine spermatozoa selected after swim-up in hyaluronic acid-containing medium. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:307-315.
41. Somfai, T., Bodó, S., Nagy, S., Papp, A.B., Iváncsics, J., Baranyai, B., Gócza, E. and Kovács, A. 2002. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 37:285-290.
42. Sterzik, K., De Santo, M., Uhlich, S., Gagsteiger, F. and Strehler, E. 1998. Glass wool filtration leads to a higher percentage of spermatozoa with intact acrosomes: an ultrastructural analysis. *Hum. Reprod.* 13:2506-2511.
43. Takahashi, Y. and First, N.L. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37:963-978.
44. Trentalance, G.M. and Beorlegui, N.B. 2002. Sperm evaluation in cryopreserved bovine semen recovered by two selection methods. *Andrologia* 34:397-403.
45. Van den Bergh, M., Revelard, P., Bertrand, E., Biramane, J., Vanin, A.S. and Englert, Y. 1997. Glass wool column filtration, an advantageous way of preparing semen samples for intracytoplasmic sperm injection: an auto-controlled randomized study. *Hum. Reprod.* 12:509-513.
46. Van der Ven, H.H., Jeyendran, R.S., Al-Hasani, S., Tünnerhoff, A., Hoebbel, K., Diedrich, K., Krebs, D. and Perez-Pelaez, M. 1988. Glass wool column filtration of human semen: relation to swim-up procedure and outcome of IVE. *Hum. Reprod.* 3:85-88.
47. Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reprod. Sci* 60-61:481-492.
48. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill JD (Eds), New York, USA, Raven Press, 1994, pp. 189-317.