

Introducción a las técnicas de capacitación espermática: un proceso *in vitro*

Introduction to the sperm capacitation techniques: an *in vitro* process

Jorge Salazar Cartín
Laboratorio Clínico, Instituto de las Mujeres Dr. Adolfo Carit Eva, CCSS

Artículo recibido el 18/12/2018
Aceptado para su publicación el 21/12/2018

Correspondencia: bladius7@yahoo.com

Resumen

Las técnicas de capacitación espermática son un requisito previo para la realización de cualquier técnica de reproducción asistida tanto de baja complejidad como de alta complejidad. Buscan reproducir un complejo proceso biológico que ocurre *in vivo* entre los órganos reproductivos masculinos y femeninos. Aunque inicialmente estas técnicas se limitaban a realizar un simple lavado de los espermatozoides, actualmente se han desarrollado y se continúan desarrollando múltiples técnicas cada vez más sofisticadas de capacitación espermática. Las técnicas más utilizadas en el laboratorio de andrología son el Swin Up y los gradientes discontinuos de densidad.

Palabras Clave: Capacitación espermática, preparación de semen, Simple Wash, Swim Up, gradientes de densidad discontinuo.

Abstract

Sperm capacitation techniques are a prerequisite for any assisted-reproduction technique either of low or high complexity. These, *in vitro* techniques, aim to reproduce a complex biological process that occurs inside the male and female reproductive organs. Although, initially these techniques were limited to the simple wash of the spermatozoids, subsequent sophistication has steadily increased. Here, I introduce and explain two of the state of the arts techniques currently use in the andrology laboratory, namely Swin Up and Discontinuous Density Gradients.

Keywords: Sperm Capacitation, Semen Preparation, Simple Wash, Swim Up, Gradients of Discontinuous Density.

Introducción

Austin en 1951 y 1952 ⁽¹⁾ y Chang en 1951 ⁽²⁾ describieron, independientemente, cambios en los espermatozoides de mamíferos no humanos que eran requisito para la fecundación de ovocitos *in vivo*. Estos cambios fueron descritos como la adquisición de una “capacidad fertilizante”. Este proceso adquirido fue denominado “capacitación” por Austin en 1952 ⁽³⁾, y ocurre únicamente después que el espermatozoide ha pasado un período de tiempo en el tracto reproductivo femenino; a esto último se le conoce como “residencia espermática”, un término introducido por Austin y Bishop en 1958 ⁽⁴⁾. Recientemente, varios modelos en animales han sugerido que la definición extendida de Austin debería incluir también la reacción acrosomal. Ya que se ha evidenciado que esta comienza desde que el espermatozoide hace contacto con el complejo cúmulo ovocitario, condición de importancia crítica para la penetración del espermatozoide a través del complejo y no como se creía anteriormente al contacto con la zona pelúcida del ovocito ⁽⁴⁾.

Los espermatozoides pueden requerir ser separados del plasma seminal para una variedad de propósitos como pueden ser pruebas diagnósticas o procedimientos de reproducción asistida, tanto de baja complejidad como de alta ⁽⁵⁾. Si bien el plasma seminal ayuda a los espermatozoides a penetrar el mucus cervical ⁽³⁾, algunos de sus componentes como las prostaglandinas y el zinc, entre otros, son un obstáculo para conseguir la concepción cuando barreras naturales son superadas ⁽⁵⁾. Es así como en parte nos vemos obligados a reproducir parte del proceso biológico de la capacitación espermática en el laboratorio. Este paso de *in vivo* a *in vitro* es de gran importancia.

La calidad del procesamiento de las muestras de esperma es uno de los factores que determina el éxito de los procedimientos de reproducción asistida ⁽⁶⁾. La meta de los procedimientos de capacitación espermática es conseguir concentrar en un volumen reducido una población de espermatozoides con un gran porcentaje de gametos morfológicamente normales y móviles, a su vez libres de detritos, células no espermáticas y espermatozoides muertos.

Los primeros métodos de separación de espermatozoides fueron uno o dos procedimientos de lavado con la subsecuente resuspensión de los gametos ⁽⁷⁾. Luego los investigadores describieron un único lavado seguido de un procedimiento de Swim Up del sedimento de los espermatozoides. A partir de estos primeros reportes de separación de espermatozoides, métodos más sofisticados fueron desarrollados para obtener cantidades suficientes de espermatozoides móviles, funcionales y capaces de ejecutar la fertilización de los oocitos. Antes de procesar el esperma se recomienda incubar el semen a una temperatura ~37 grados Celsius por al menos 15 minutos, hasta obtener la licuefacción completa. Es crítico que los espermatozoides sean separados del plasma seminal antes de una hora ⁽⁵⁾. La exposición de los espermatozoides al plasma seminal por más de 60 minutos después de la eyaculación disminuye la capacidad fertilizadora ⁽⁸⁾. La técnica de Simple Wash se considera obsoleta para la realización de procedimientos de inseminación artificial, frente a las técnicas más recientes y se ha recomendado abandonar su uso ⁽⁸⁾.

La técnica de capacitación espermática ideal debería cumplir con los siguientes requisitos:

- 1) Ser de rápida ejecución
- 2) Sencilla
- 3) De bajo costo
- 4) Separar la mayor parte de la población móvil de espermatozoides como sea posible
- 5) Concentrar la muestra
- 6) No causar daño ni alteraciones fisiológicas a los espermatozoides
- 7) Eliminar los espermatozoides muertos, leucocitos, células epiteliales, células inmaduras y microorganismos
- 8) Eliminar sustancias tóxicas o bioactivas como factores decapacitantes, radicales libres, anticuerpos o fármacos
- 9) Disminuir la viscosidad de la muestra
- 10) Permitir el procesamiento de grandes volúmenes de semen

Tradicionalmente se conocen tres grupos de técnicas de capacitación espermática:

- 1) Técnicas de migración (Swim Up, Swim Down, Sedimentación migración)
- 2) Gradientes de densidad (Percoll, Puresperm, Isolate, Suprasperm)
- 3) Filtración (lana de vidrio, columna de Sephadex)

Sin embargo las técnicas de gradientes de densidad y de Swim Up son las generalmente utilizadas en los laboratorios de andrología.

SELECCIÓN DE LA TÉCNICA DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

La selección de cuál técnica utilizar se encuentra supeditada a la naturaleza de la muestra de semen. La utilización de técnicas de Swim Up usualmente se escoge cuando la muestra de semen es a grandes rasgos normal, mientras que en casos de oligozoospermia severa, teratozoospermia o astenozoospermia los gradientes de densidad son preferidos ya que un número total de espermatozoides móviles es recuperado⁽⁵⁾. Las técnicas también pueden ser modificadas para optimizar el manejo de propiedades específicas de las muestras individuales. Por ejemplo, al utilizar la técnica de gradientes de densidad, en el caso de un esperma viscoso se puede utilizar un paso previo de lavado o aumentar el tiempo de la centrifugación. En el caso de muestras oligozoospermicas o astenozoospermicas se puede disminuir el volumen de los gradientes para disminuir la distancia de migración de los espermatozoides.

Cada laboratorio debe determinar la fuerza centrífuga y el tiempo necesario para formar un botón manejable de espermatozoides. Cuando las cantidades de espermatozoides son extremadamente bajas es posible que sea necesario modificar la fuerza y el tiempo de centrifugación para poder obtener la cantidad suficiente de gametos.

Las técnicas de Swim Up generalmente producen recuperaciones menores (<20 %) que los gradientes de densidad (>20 %) ⁽⁵⁾. Ambas técnicas también difieren en el nivel de contaminación con otros

componentes seminales en la preparación final. Utilizando el zinc como marcador de componentes seminales solubles Björndahl y colaboradores demostraron una difusión tiempo dependiente en la capa sobrenadante de medio en el Swim Up ⁽⁸⁾. De lo anterior se concluye que las preparaciones logradas mediante gradientes de densidad presentan menor contaminación por componentes solubles que las logradas mediante Swim Up.

En un estudio reciente en Egipto una población de muestras congeladas fue dividida en cuatro alícuotas. A una alícuota no se le realizó ningún procedimiento (control), a otra se le realizó gradientes de densidad, a otra Swim-up, y a una última se le realizó Simple Wash ⁽⁹⁾. Se obtuvieron los siguientes promedios de poblaciones de espermatozoides móviles progresivos:

Control:	56.5%
Gradientes:	86.0%
Swim Up:	73.0%
Simple Wash:	66.5%

Evidentemente la técnica de gradientes de densidad logró recuperar un mayor porcentaje de espermatozoides motiles progresivos. Por otro lado, la técnica de Simple Wash fue la que logró recuperar un menor porcentaje.

Se obtuvieron los siguientes promedios de poblaciones de espermatozoides con membrana intacta por HOS-Test:

Control:	69.3%
Gradientes:	87.0%
Swim Up:	76.0%
Simple Wash:	62.4%

Evidentemente la técnica de gradientes discontinuos de densidad fue la que logró preservar mejor la integridad de la membrana de los espermatozoides. Por otro lado, la técnica de Simple Wash produjo un daño mayor que el grupo control sobre los espermatozoides.

PRINCIPIOS GENERALES

Se sugiere la utilización de medios de cultivo basados en soluciones salinas balanceadas suplementadas con proteínas y ajustadas con un sistema amortiguador apropiado para las condiciones ambientales en que las técnicas se van a trabajar. Los dos sistemas amortiguadores más utilizados en andrología son el bicarbonato y el HEPES, uno para utilizar en atmósfera capnofílica y el segundo para utilizar en atmósfera aerobia. Cuando se utilizan incubadoras con atmósfera aerobia y sistema HEPES, las tapas de los tubos deben mantenerse bien cerradas. Si se utiliza atmósfera de 5% (v/v) CO₂ se prefiere sistema de bicarbonato de sodio y las tapas de los tubos deben estar sueltas para permitir el intercambio gaseoso. Es imperativo el uso de suplemento de albúmina humana, la cual debe ser altamente purificada y libre de microorganismos. Muchos medios de cultivo comerciales ya vienen suplementados con albúmina.

El esperma para este tipo de procedimientos debe ser recolectado de la manera más aséptica posible. Se recomienda que el paciente se lave bien las manos y el pene con jabón para reducir el riesgo de contaminación del espécimen con organismos comensales de la piel, luego debe enjuagarse bien el jabón y secarse muy bien la piel con una toalla desechable ⁽⁵⁾. También se recomienda, a la hora de tomar la muestra, evitar el contacto de la piel con las paredes del recipiente recolector. También todo el material utilizado durante el procedimiento de capacitación espermática para manipular la muestra y los reactivos deben ser estériles.

Tanto las muestras iniciales como los preparados finales deben ser analizados. Debe reportarse evaluación macroscópica, motilidad y concentración como mínimo.

TÉCNICA DE SIMPLE WASH

Si bien es cierto que la técnica de Simple Wash se considera obsoleta para procedimientos de inseminación artificial, y no se recomienda su uso de manera única, al menos que se vaya a efectuar alguna técnica de reproducción asistida de alta complejidad, resulta útil utilizarla como complemento de alguna otra técnica de capacitación espermática.

Reactivos:

Medio BWW, Earle, HAMF10, HTF o medio comercial, puede requerir suplementación con albúmina humana.

Procedimiento:

- 1) Se mezcla bien la muestra (con pipeta pasteur plástica, al menos 5 veces)
- 2) Se diluye, usualmente partes iguales, del semen y el medio de cultivo que puede ser suplementado
- 3) Se transfiere la dilución de esperma en medio a un tubo
- 4) Se centrifuga a 300-500 g por 5 a 10 minutos
- 5) Cuidadosamente se aspira y se desecha el sobrenadante
- 6) Se resuspende el botón de espermatozoides con un pipeteo suave en medio de cultivo, usualmente en un volumen de 2 ml
- 7) Se centrifuga nuevamente entre 300-500 g por 5 minutos
- 8) Cuidadosamente se aspira y desecha el sobrenadante
- 9) Se resuspende el botón de espermatozoides con un pipeteo suave en medio de cultivo. El volumen de medio depende del uso que se le vaya a dar al lavado de espermatozoides

Cuando se utilizan volúmenes altos (>3 ml) de dilución en el tubo del primer lavado se debe aumentar el tiempo y la fuerza centrífuga ⁽⁵⁾. Por ejemplo, se pueden utilizar 500-600 g por 10-15 minutos.

TÉCNICAS DE SWIM UP

Este es un grupo de técnicas basadas en la capacidad de migración de los espermatozoides. Los espermatozoides migran del plasma seminal al medio de cultivo. Algunos autores recomiendan que el

semen no sea diluido ni centrifugado antes del procedimiento para evitar daño oxidativo a las membranas ⁽⁵⁾. Por otro lado, Volpes y colaboradores encontraron que el utilizar Swim Up de botón (tras haber eliminado el plasma seminal por lavado) logra preparaciones finales con mucho menor grado de fragmentación del ADN ⁽¹⁰⁾, esto debido al daño que sufren los espermatozoides al exponerse al plasma seminal, como lo demuestra el estudio de Tvrdá y colaboradores ⁽¹¹⁾.

SWIM UP DIRECTO

El Swim Up directo puede ser realizado colocando el medio de cultivo sobre el esperma licuado o colocando el esperma licuado por debajo del medio de cultivo. Esta técnica logra preparaciones finales con menor concentración de espermatozoides, pero los selecciona por su motilidad.

Reactivos

Medio BWW, Earle, HAMF10, HTF o medio comercial, puede requerir suplementación con albúmina humana.

Procedimiento

- 1) Se mezcla bien la muestra (con pipeta pasteur plástica, al menos 5 veces)
- 2) Se coloca 1 ml de semen en un tubo (puede ser un tubo cónico de 15 ml o un tubo de fondo redondo de 10 ml)
- 3) Suavemente colocar una capa de 1.2 ml de medio de cultivo sobre el semen
- 4) Si la muestra tiene una alta concentración y motilidad espermática, y se desea maximizar la selección de los espermatozoides, se puede realizar la incubación a 90 grados. Usualmente se utiliza una inclinación de 45 grados, para incrementar el área de exposición entre la interfase medio/semen ⁽⁵⁾. Por esta misma razón si la muestra tiene una baja concentración y motilidad espermática, y se desea maximizar la recuperación de los espermatozoides, se puede realizar la incubación a 30 grados de inclinación
- 5) Se incuba hasta que el medio de cultivo se enturbie (se puede revisar cada 30 minutos) sin exceder los 60 minutos ⁽⁸⁾. La incubación usualmente se hace a 37°C, sin embargo, Otsuki y colaboradores demostraron que muestras capacitadas a 34.5°C preservan mejor su motilidad a lo largo del tiempo ⁽¹²⁾, por lo que se recomienda realizar el procedimiento a esta temperatura
- 6) Se coloca suavemente el tubo en posición vertical y se remueve 1 ml de medio de cultivo. Este contendrá los espermatozoides móviles recuperados
- 7) Se diluye el esperma con 1.5 a 2.0 ml de medio de cultivo
- 8) Se centrifuga a 300-500 g por 5 minutos, cuidadosamente se aspira y descarta el sobrenadante
- 9) Se resuspende el botón de espermatozoides en 0.5 ml de medio de cultivo

SWIM UP DE BOTÓN O POSLAVADO

El Swim Up de botón puede ser realizado colocando medio de cultivo sobre un botón de espermatozoides obtenido tras un lavado. Esta técnica logra preparaciones finales con menor concentración de espermatozoides, pero los selecciona por su motilidad. Para esta técnica en particular es recomendable

utilizar tubos de fondo redondo de 10 ml cuando se utiliza centrifuga de rotor móvil y tubos cónicos de 15 ml cuando se utiliza centrífuga de rotor fijo de 35 grados, esto para incrementar el área de exposición entre la interfase medio/semén ⁽⁸⁾.

Reactivos

Medio BWW, Earle, HAMF10, HTF o medio comercial, puede requerir suplementación con albúmina humana.

Procedimiento

- 1) Se mezcla bien la muestra (con pipeta pasteur plástica, al menos 5 veces)
- 2) Se coloca el esperma en un tubo (puede ser un tubo cónico de 15 ml o un tubo de fondo redondo de 10 ml)
- 3) Se diluye con medio de cultivo a una proporción de 1:2
- 4) Se centrifuga a 300-500 g por 10 minutos, cuidadosamente se aspira y se descarta el sobrenadante
- 5) Suavemente se coloca 1.2 ml de medio de cultivo sobre el botón de espermatozoides
- 6) Si la muestra tiene una alta concentración y motilidad espermática, y se desea maximizar la selección de los espermatozoides, se puede realizar la incubación a 90 grados. Usualmente se utiliza una inclinación de 45 grados, para incrementar el área de exposición entre la interfase medio/semén ⁽⁵⁾. Por esta misma razón si la muestra tiene una baja concentración y motilidad espermática, y se desea maximizar la recuperación de los espermatozoides, se puede realizar la incubación a 30 grados
- 7) Se incuba hasta que el medio de cultivo se enturbie (se puede revisar cada 15 minutos) sin exceder los 60 minutos ⁽⁸⁾. La incubación usualmente se hace a 37°C, sin embargo, Otsuki y colaboradores demostraron que muestras capacitadas a 34.5°C preservan mejor su motilidad a lo largo del tiempo ⁽¹²⁾, por lo que se recomienda realizar el procedimiento a esta temperatura
- 8) Se coloca suavemente el tubo en posición vertical y se remueve 1 ml de medio de cultivo. Este contendrá los espermatozoides móviles recuperados
- 9) Se diluye el esperma con 1.5 a 2.0 ml de medio de cultivo
- 10) Se centrifuga a 300-500 g por 5 minutos, cuidadosamente se aspira y se descarta el sobrenadante
- 11) Se resuspende el botón de espermatozoides en 0.5 ml de medio de cultivo

TÉCNICAS DE GRADIENTES DE DENSIDAD DISCONTINUA

Esta técnica puede proveer la mejor selección de espermatozoides debido a la buena separación de otras células y detritos. Es más fácil de estandarizar que el Swim Up y sus resultados son más consistentes. Utiliza un principio de centrifugación de semen a través de un gradiente coloidal de densidad discontinua que separa los componentes espermáticos de acuerdo a su densidad. Además, los espermatozoides móviles nadan activamente a través del material del gradiente para formar un botón de espermatozoides al fondo del tubo. Pueden utilizarse espermatozoides lavados y resuspendidos en medio, esto puede ayudar principalmente a disminuir la viscosidad de la muestra.

Inicialmente los gradientes de densidad fueron ideados utilizando Percoll como matriz para preparar los gradientes. Sin embargo, en 1993 el fabricante retiró el producto para uso en reproducción asistida en humanos, debido al riesgo de contaminación con endotoxinas inherente a su fabricación ⁽¹³⁾. Aún su uso es permitido en reproducción asistida para animales.

La matriz de Percoll ha sido sustituida por albúmina entre otros materiales; sin embargo, se ha extendido ampliamente el uso de sílica coloidal recubierta de silano. Un método simple de dos gradientes es el más frecuentemente aplicado. Usualmente se utiliza un gradiente de 40% (v/v) sobre otro de 80% (v/v). La preparación del semen utilizando centrifugación con gradientes de densidad usualmente resulta en una fracción de espermatozoides altamente motiles, libres de detritos, de contaminación con leucocitos, sin células no espermáticas ni espermatozoides degenerados. Existen varias preparaciones comerciales apropiadas para la realización de esta técnica. Los últimos cuidados y detalles del procedimiento deben ajustarse a las indicaciones del fabricante.

Reactivos

Medio BWW, Earle, HAMF10, HTF o medio comercial, puede requerir suplementación con albúmina humana.

Medio de gradiente de densidad isotónico comercialmente disponible. Puede adquirirse al 100% de concentración y preparar los gradientes de trabajo diluyendo en solución amortiguadora o medio de cultivo. Y también puede adquirirse ya preparado en las concentraciones de trabajo.

Procedimiento

- 1) Si no se dispone de los medios a concentración de trabajo, se preparan los gradientes a concentraciones de 80 % y 40 %
- 2) Se mezcla bien la muestra (con pipeta pasteur plástica, al menos 5 veces)
- 3) Se coloca 1 ml de gradiente de 80 % y 1 ml de gradiente de 40 % sobre el gradiente anterior en un tubo cónico de 15 ml. En casos de pacientes con oligozoospermias severas o astenozoospermias se puede modificar el volumen, el número o la concentración de los gradientes
- 4) Se coloca suavemente la muestra sobre el gradiente de densidad. Puede utilizarse el esperma lavado y resuspendido si se requirió disminuir la viscosidad de la muestra
- 5) Se centrifuga entre 300-400 g por 15-30 minutos. Puede ser necesario utilizar más de un tubo para evitar la saturación del gradiente
- 6) Cuidadosamente se aspira y se desecha la mayor parte del sobrenadante
- 7) Se resuspende suavemente el botón de espermatozoides en 5 ml de medio de cultivo
- 8) Se centrifuga a 300 g por 10 minutos
- 9) Cuidadosamente se aspira y se desecha el sobrenadante, y se resuspende el botón de espermatozoides en 0.5 ml de medio de cultivo

Conclusión

Las técnicas de reproducción asistida de baja complejidad son las más utilizadas en el mundo debido a su relativa simplicidad y a su bajo costo. Tanto para estas como para las de alta complejidad, es necesario realizar una preparación de la muestra de semen conocida como capacitación espermática. Esta técnica busca reproducir de manera parcial el proceso biológico de la capacitación espermática que ocurre en vivo. Esencialmente lo que estas técnicas *in vitro* buscan lograr es la separación, selección y concentración de una población de espermatozoides móviles y de morfología normal a partir del eyaculado. Esto debe hacerse lo más rápido posible. El contacto con el plasma seminal desencadena un proceso de fragmentación del ADN espermático ⁽¹¹⁾. Lo que le va restando capacidad fertilizadora a los espermatozoides.

La selección de la mejor técnica de capacitación espermática depende de las características particulares de cada muestra ⁽¹⁴⁾. Estas mismas particularidades de cada muestra deben ser tomadas en cuenta para modificar también la técnica escogida de tal forma que se pueda optimizar el mejor resultado que algunas veces implicará maximizar la técnica en un sentido y otras veces será en un sentido contrario.

Referencias

- 1) Bavister B. Early history of in vitro fertilization. *Reproduction*. 2002; 124(2) 181-196 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12141931>
- 2) Gervasi M, Visconti P. Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. *Mol Reprod Dev*. 2016; 83(10):860-874 <https://doi.org/10.1002/mrd.22663>
- 3) De Jonge, C. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod*, 2005; 3:205-214 <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi010>
- 4) De Jonge, C. Biological basis for human capacitation - Revised. *Human Reproduction Update*. 2017; 23(3):289–299 <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw048>
- 5) Cooper T, Aitken J, Auger, J et al. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5ta edición, WHO Press. 2010; 160 – 190 http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf
- 6) Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E et al. Semen quality and intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online*. 2003;7(4):485-92. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656412>
- 7) Poenicke K, Grunewald S, Glander, H et al. Sperm Selection in Assisted Reproductive Techniques in: Rao K, Agarwal A, Srinivas M. *Andrology Laboratory Manual*. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) LTD. Primera Edición. 2010; 173 – 182.
- 8) Björndahl L, Mortimer D, Barratt C et al. *A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology*, 1ra edición, Cambridge University Press; 2010; 167 – 188.
- 9) Abdel-Razek K, Hassan A, Senosy W et al. Effect of Sperm Separation Methods on Morphology and Functions of Frozen Buffalo Spermatozoa. *J. Adv. Vet. Res*. 2017; 7 (1): 18-23
- 10) Volpes A, Sammartano F, Rizzari S, Gullo S, Marino A, Allegra A. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(6):765-70. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0696-2>

- 11) Tvrđá E, Arroyo F, Duracka M et al. fragmentación del ADN espermático: Factores que importan más de los esperados. *Reproducción*. 2018; 33(S1):26. http://www.samer.org.ar/revista/nros_completos/rev_reproduccion_vol33-sup1.asp
- 12) Otsuki J, Chuko M, Momma Y et al. A comparison of the swim-up procedure at body and testis temperatures. *J Assist Reprod Genet*. 2008;25(8):413-5. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9242-1>
- 13) Matás C, Vieira L, García-Vázquez F et al. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Anim. Reprod. Sci*. 2011; 127(1-2):62-72 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.06.009>
- 14) Selvaraj P, Selvaraj K, Kalaichelvi S, Mahalakshmi R. Semen preparation techniques in intrauterine insemination: A comparison of non-temperature and temperature controlled centrifugation in cases of unexplained infertility. *J Hum Reprod Sci*. 2013;6(4):241-4. <https://dx.doi.org/10.4103%2F0974-1208.126289>