

Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen[ⓧ]

Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino

Métodos de avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino

Giovanni Restrepo Betancur^{1*}, Ztc, MV, MSc, cPhD; Alexandra Úsuga Suárez¹, MVZ;
Benjamín Alberto Rojano², Químico, MSc, Ph.D.

**Autor para correspondencia: Giovanni Restrepo Betancur. Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Carrera 48 N° 7 -151. Bloque P19, Oficina 119, Medellín, Colombia. E-mail: grestrepo@elpoli.edu.co*

¹Grupo de Investigación en Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, Colombia

²Grupo de Investigación Ciencia de los Alimentos, Escuela de Química, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia.

(Recibido: 25 de febrero, 2013; aceptado: 17 de mayo, 2013)

Abstract

In order to optimize the results of assisted reproductive procedures such as artificial insemination, the potential fertility of stallion semen should be determined. However, conventional processes of seminal evaluation can give an low predictive value of the pregnancy rate. For this reason, the new methods of semen analysis incorporate several technological resources and improve the existing techniques. In many cases those techniques have been adapted to the equine species. The development of the computer-assisted semen analysis (CASA) has allowed a more objective and accurate sperm evaluation, including the identification of new variables with diagnostic value. The finding of a wide variety of fluorochromes and compounds conjugated with fluorescent probes, and the development of various technologies to visualize and quantify the fluorescence emitted by the cell and cell compartments allows a more complete sperm analysis. The application of tests or techniques using oocytes from other species or even parts of the zona pellucida has favored a more accurate diagnosis of the true sperm fertilizing capacity in horses. The aim of this review is to provide and analyze information on recent conventional methods used to assess the potential fertility of stallion semen.

Key words

CASA, evaluation seminal, fertilizing capacity, fluorescence.

[ⓧ]Para citar este artículo: Restrepo Betancur G, Úsuga Suárez A, Rojano BA. Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. Rev CES Med Zootec. 2013; Vol 8 (1): 115-127.

Resumen

Para optimizar los resultados se debe determinar la fertilidad potencial del semen equino usado en procedimientos de reproducción asistida, tales como la inseminación artificial. Sin embargo, los procesos convencionales de evaluación seminal pueden dar un bajo valor predictivo de la tasa de gestación. Por tal motivo se han desarrollado nuevos métodos de análisis seminal, incorporado diversos recursos tecnológicos y mejorado las técnicas existentes, y en muchos casos adaptándolas a la especie equina. El desarrollo de los sistemas de análisis de semen asistido por computador (CASA) ha permitido que la evaluación espermática sea más objetiva y precisa, incluyendo la determinación de nuevas variables con valor diagnóstico. El hallazgo de una amplia variedad de fluorocromos y de compuestos conjugados a sondas fluorescentes y el desarrollo de diferentes tecnologías para visualizar y cuantificar la fluorescencia de la célula y sus compartimentos permite un análisis más completo de los espermatozoides. La aplicación de ensayos o técnicas que utilizan oocitos de otras especies o incluso partes de la zona pelúcida ha favorecido el diagnóstico más certero de la verdadera capacidad fecundante de los espermatozoides equinos. El objetivo de esta revisión es ofrecer y analizar información sobre los métodos convencionales y recientes empleados para evaluar la fertilidad potencial del semen equino.

Palabras clave

Capacidad fecundante, CASA, evaluación seminal, fluorescencia.

Resumo

Determinar a fertilidade potencial do sêmen equino utilizado em procedimentos de reprodução assistida como a inseminação artificial, é fundamental para aperfeiçoar seus resultados. Embora, os procedimentos convencionais de avaliação seminal poderiam ter um valor preditivo reduzido das taxas de gestação que se podem obter a partir da utilização deste. Por tal motivo, tem se desenvolvido novos métodos de análise seminal, incorporando diversos recursos tecnológicos e melhorando as técnicas existentes, e em muitas ocasiões adaptando-lhas a espécie equina. O desenvolvimento dos sistemas de análise de sêmen assistido por computador (CASA), tem permitido que a avaliação espermática fosse mais objetiva e precisa, incluindo a determinação de novas variáveis com valor diagnóstica. Tem se encontrado uma ampla variedade de fluorocromos e de compostos conjugados a sondas fluorescentes, e o desenvolvimento de diferentes tecnologias para visualizar e quantificar a fluorescência emitida pela célula e seus compartimentos, o qual tem permitido um análise mais ampla das características dos espermatozoides. A aplicação de ensaios ou técnicas que utilizam ovócitos de outras espécies ou incluso partes da zona pelúcida, tem favorecido dispor de sistemas de diagnóstico mais certos da verdadeira capacidade fecundante dos espermatozoides equinos. Esta revisão tem como objetivo, recopilar e analisar informação referente aos métodos convencionais e recentes, que poderiam ser empregados para a avaliação da fertilidade potencial do sêmen equino.

Palavras chave

Avaliação seminal, capacidade fecundante, CASA, fluorescência.

Introducción

La determinación de la capacidad fecundante del semen es fundamental para optimizar los resultados de las tecnologías de reproducción asistida aplicadas a programas de cría de la especie equina, como la inseminación artificial y la fertilización *in vitro*. La evaluación de la “fertilidad potencial” es una parte importante para la selección de los machos equinos, y para el manejo de los sistemas de cría¹⁴. La determinación de parámetros seminales de rutina, el conocimiento de la fertilidad histórica y un cuidadoso examen físico del sistema reproductivo, constituyen las bases fundamentales para una completa evaluación del macho equino, y una valiosa herramienta para la investigación de problemas de fertilidad^{3,8}. A pesar de que se ha sugerido que la calidad del semen tiene un papel importante en la determinación de la fertilidad, es conocido que el valor predictivo de los diferentes parámetros evaluados en un análisis espermático convencional, es limitado respecto al diagnóstico temprano de la gestación o la obtención de gestaciones a término. Esto puede ser debido a que la fertilidad incluye numerosos factores adicionales a los que se refieren exclusivamente a la calidad seminal, existiendo subpoblaciones espermáticas que difieren en cuanto a su potencial fertilizante en una misma muestra³⁴. Sin embargo, se han reportado altas correlaciones entre la fertilidad y diferentes parámetros de calidad seminal como la movilidad y la morfología espermática²⁷.

Con el fin de potenciar y complementar el valor predictivo de la evaluación espermática, se han incorporado diferentes métodos citológicos directos e indirectos, y novedosos recursos tecnológicos para evaluar la integridad, la vitalidad y la funcionalidad de los espermatozoides y sus organelas. Diversos procedimientos de fijación de células y de tinción de compartimentos celulares, se han implementado para mejorar las evaluaciones convencionales desarrolladas por microscopía^{15,30}. Al igual que se han investigado las condiciones precisas de funcionamiento de estas técnicas aplicadas a espermatozoides equinos, como sería el caso del desarrollo de métodos específicos de tinción, o la evaluación de las concentraciones óptimas para la realización de la prueba hiposmótica (HOS)^{31,36}.

Con el desarrollo de sistemas de análisis de semen

asistido por computador (CASA), la evaluación espermática se ha tornado más objetiva, ha incluido y facilitado la determinación de nuevas variables con valor diagnóstico; al igual que se han incorporado métodos de análisis tan específicos, como lo permiten los actuales desarrollos en microscopía de fluorescencia^{13,14,30}. Todo esto, con un éxito para la especie equina equiparable a la evaluación de semen en humanos y otras especies animales^{23,51}. El hallazgo de una amplia variedad de fluorocromos y de compuestos conjugados a sondas fluorescentes, y el desarrollo de diferentes tecnologías para la visualización y cuantificación de la fluorescencia emitida por la célula y los compartimentos celulares, han permitido un análisis más amplio de los atributos de los espermatozoides equinos^{5,14}; con lo cual se ha logrado explorar incluso la integridad ultraestructural, así como la funcionalidad de mecanismos trascendentales para el logro de la fertilización como la capacitación espermática⁴⁶. A pesar de la reducida eficiencia de la fertilización *in vitro* convencional en equinos, la aplicación de ensayos o técnicas que utilizan oocitos de otras especies⁶, o incluso partes de la zona pelúcida³³, ha permitido disponer de sistemas de diagnóstico más certeros, de la verdadera capacidad fecundante de los espermatozoides equinos.

Esta revisión tiene como objetivo, recopilar y analizar información referente a los métodos convencionales, y a aquellos métodos desarrollados de forma más reciente, que pueden ser empleados para la evaluación de la fertilidad potencial del semen equino.

Técnicas convencionales de evaluación seminal

Con el fin de predecir la fertilidad potencial del semen equino, el análisis de rutina es basado en la evaluación macroscópica-física del eyaculado, y en la evaluación por microscopía de los espermatozoides^{41,42}. Este análisis, convencionalmente ha incluido la determinación de aspectos como el volumen de semen, la presencia de sangre, orina o bacterias potencialmente patógenas, la concentración de espermatozoides, la proporción de vivos y muertos, el análisis de las características morfológicas de las células espermáticas, la movilidad total, la movilidad progresiva, e incluso la velocidad del movimiento, y la duración de la movilidad de los espermatozoides después del almacenamiento *in vitro*⁵⁴.

La determinación de la movilidad de los espermatozoides es considerada como la base de la evaluación rutinaria de la calidad del semen equino⁵¹. La movilidad espermática es evaluada usando un microscopio óptico de contraste de fase y un ambiente térmico. La muestra se evalúa en función del porcentaje de células en movimiento. Sin embargo, hay varios tipos de movimiento de los espermatozoides (vibratorio, circular, oscilatorio, progresivo lento y rápido), cuyas clasificaciones pueden ser empleadas para las diferentes especies⁴⁶. Los análisis del semen por microscopía pueden desarrollarse en submuestras de semen fresco para la determinación de la movilidad; de semen fijado con formaldehído o glutaraldehído como un método para la evaluación morfológica; o de semen teñido para la observación de la fertilización *in vitro* o de las diferencias en la estructura de las organelas¹⁵. La repetibilidad de las evaluaciones de la movilidad espermática, son generalmente mayores cuando se utiliza semen diluido en lugar de semen fresco (62% vs. 41%), razón por la cual es importante realizar estimaciones de movilidad total y progresiva luego de la dilución seminal. En algunos equinos, es posible encontrar una alta proporción de espermatozoides con movilidad circular inmediatamente después de realizar este proceso. En estos casos, es necesario un periodo de incubación del semen de 5 a 10 minutos, antes de evaluar dichos parámetros³.

Determinar la concentración de un eyaculado es uno de los pasos más importantes en la evaluación seminal, dado que además de proveer información sobre la capacidad fecundante, también es necesario para definir las tasas de dilución, o la cantidad de dosis para la inseminación artificial. La concentración seminal se evalúa por el método del hematocitómetro, o por espectrofotometría mediante sistemas automatizados como el *densímetro equino*® (Animal Reproduction Systems) o el *Spermecue*® (Minitube), los cuales consisten en sistemas portátiles y rápidos, que tienen como limitante su alto costo, y el hecho de ser precisos solamente con semen fresco²⁸. Los contadores electrónicos de partículas (Coulter) y la citometría de flujo, pueden emplearse también para determinar la concentración espermática. Sin embargo, el costo de obtención, operación y mantenimiento de estos equipos limita su uso para evaluaciones de rutina para semen equino^{3,34}.

Existen varios sistemas para evaluar la morfología de los espermatozoides. Las anomalías en los espermatozoides pueden dividirse en primarias y

secundarias. Las anomalías primarias se considera que son aquellas que provienen del testículo durante la espermatogénesis, mientras las anomalías secundarias se considera que ocurren después de que los espermatozoides abandonan el testículo. Otro sistema de clasificación define las anomalías en categorías menores o mayores, haciendo especial énfasis en su efecto sobre la fertilidad¹⁵. Un método simple para la evaluación morfológica consiste en realizar una tinción de una muestra de semen con tinta china. El fondo negro contrasta con el semen sin color, y la morfología es fácil de determinar mediante microscopía de campo claro. Otro método es la tinción *Diff-Quik*, una técnica sencilla y rápida compuesta por un fijador (metanol), un colorante aniónico ácido (eosina) que tiñe positivamente las proteínas básicas de color rojo, y por una tiazina (azul de metileno o sus derivados) que tiñe el ADN de azul. Sin importar el método elegido, se deben observar un total de 200 espermatozoides con el objetivo de 100X con aceite de inmersión y registrar el número de defectos observados⁴⁶. Un análisis ultraestructural incluye la evaluación en cada eyaculado de 200 acrosomas, cabezas, piezas medias, y secciones transversales de la cola, al igual que 100 secciones longitudinales de la cola^{4,42}.

Un espermatozoide equino normal, difiere en algunos aspectos respecto a los espermatozoides de otras especies domésticas. La unión abaxial de la pieza intermedia, una leve asimetría en la cabeza, un menor volumen acrosomal y el menor tamaño de la cabeza, son características que permiten distinguir a los espermatozoides equinos normales. Sin embargo, es importante resaltar que el porcentaje de esta población espermática en el equino, es menor respecto a otras especies domésticas, reportándose entre un 50% y un 60% de normalidad en la mayoría de estudios realizados³.

La integridad de la membrana plasmática puede ser considerada como un indicador indirecto de la vitalidad de los espermatozoides³⁰. La prueba hipoosmótica (HOS), es una técnica desarrollada para evaluar la funcionalidad e integridad de la membrana plasmática de estos; su principio consiste en que al ser sometidos a condiciones hipoosmóticas, solamente los espermatozoides bioquímicamente activos permitirán la entrada de agua y mostrarán diferentes grados de turgencia. La afluencia de agua solo se produce en la región de la cola y crea diferentes tipos de enrollamiento, lo cual es una señal de que el agua ha sido transportada de una manera fisiológica

en la célula, en un esfuerzo por mantener la dinámica de equilibrio entre los líquidos de su compartimiento interno y el entorno extracelular²². Esta respuesta se asocia con el grado de integridad normal y de actividad funcional de la membrana, requisito indispensable para que se dé la reacción acrosómica durante el proceso de fertilización⁴⁷.

Neild *et al*³⁷, evaluaron la prueba hipoosmótica en semen equino fresco, con soluciones de fructosa, sacarosa, lactosa y citrato de sodio a 25, 50, 100, 150 y 300 mOsm, encontrando mayores porcentajes de espermatozoides reaccionados para fructosa, sacarosa y lactosa, cada una a 25, 50 y 100 mOsm.

Existen diversos métodos diseñados para la evaluación de la vitalidad y el estado del acrosoma en muestras teñidas. Entre los métodos de tinción están eosina-nigrosina, eosina-verde rápido, la tinción de *Giemsa*, la tinción triple, y la tinción *Spermac*³⁰. El acrosoma de espermatozoides no teñidos e incluso móviles y no fijados, puede ser evaluado por microscopia de contraste de fase o de contraste por interferencia diferencial. Otras

técnicas requieren generalmente de la tinción de la región acrosomal, siendo la estrategia más común, el uso de un colorante para la tinción del acrosoma, y un colorante diferente para la tinción nuclear, con el fin de lograr contraste en la región posterior de la cabeza, y así reducir la cantidad de colorante acrosomal incorporado por el núcleo. El método de tinción triple (Bismark marrón, Rosa Bengala y Tripán azul) es quizás el más ampliamente usado en espermatozoides equinos y de otras especies.

Entre estas diversas metodologías convencionales de evaluación de la calidad seminal, la movilidad y la morfología han sido altamente correlacionadas con la fertilidad potencial mediante la evaluación de parámetros como la tasa de preñez estacional, el porcentaje de preñez por ciclo y el porcentaje de preñez al primer ciclo^{4,27}. Otros parámetros como la prueba HOS y la vitalidad han sido correlacionados con la movilidad progresiva y la morfología normal^{30, 48}. La tabla 1 muestra los resultados de evaluación de diferentes parámetros espermáticos en semen equino fresco y criopreservado.

Tabla 1. Evaluación de diferentes parámetros en el semen equino fresco y criopreservado.

Autor(es)	Volumen (ml) / Concentración (x 10 ⁹)	Movilidad progresiva (%)	Vitalidad (%)	Morfología normal (%)	Prueba HOS Reaccionados (%)
Semen Fresco					
Villa <i>et al.</i> ⁵⁶	42.3 ± 4.1 / 198.7 ± 27.6	61.6 ± 4.1 41.1 ± 13.1		61.3 ± 4 43.4 ± 19.9	56.1 ± 14.2 56.2 ± 8.6
Neild <i>et al.</i> ³⁷		68.3 ± 3.7			
Pérez-Osorio <i>et al.</i> ⁴¹		73 ± 6.3	81 ± 5.2		
Cocchia <i>et al.</i> ⁷	/ 173 ± 8.4	41.5 ± 5.4			
Kankofer <i>et al.</i> ²¹	44.1 ± 5.1 / 125.4 ± 10.3	67.9 ± 6.5 64.3 ± 17.1	55.1 ± 14.4 86.6 ± 4.3		
Henry <i>et al.</i> ¹⁷					
Sieme <i>et al.</i> ⁴⁹					
Semen criopreservado					
Mantovani <i>et al.</i> ³² *		47.9			52.8
Hoffmann <i>et al.</i> ¹⁹ **		56.1 ± 20.9 51.1 ± 22.2 52.9 ± 23.2 52.1 ± 23.3	32.6 ± 6.5 24.1 ± 9.1 29.4 ± 6.5 27.7 ± 7.8		
Medeiros <i>et al.</i> ²⁹ ***		15.2, 17.4, 12.6, 8.75, 19, 19	44.1, 48.3, 51.3, 32.3.		
Squires <i>et al.</i> ⁵⁰ ****		29, 35, 23, 23			
Henry <i>et al.</i> ¹⁷ *****		55.3 ± 14.3 59.5 ± 14.6 58 ± 10.1	12 ± 9.9 14.7 ± 11.4 19 ± 17.2		

Se reportan medias ± desviaciones estándar.

Gly: Glicerol; EG: Etilenglicol; MF: Metilformamida; DMF: Dimetilformamida; DA: Dimetilacetamida.

* Crioprotector Gly 3% ** Crioprotectores Gly 2%, EG 3%, MF 2%, y DMF 2%, respectivamente. Vitalidad evaluada por el método SYTO17/PI. *** Crioprotectores DA 3%, MF 5%, DF 5%, Gly 5%, Gly 3.5% + DMF 1.5%, Gly 1.5% + DMF 3.5%, respectivamente.

Movilidad evaluada por CASA (IVOS®). Vitalidad evaluada por el método CF/PI. **** Crioprotectores Gly 0.55M, MF 0.9M, DMF 0.6M y EG 0.3M, respectivamente. ***** Crioprotectores Gly 5%, EG 5%, acetamida 2.5%, respectivamente.

Sistemas de análisis de semen asistido por computador (CASA)

El uso del análisis de semen asistido por computador (CASA) ha permitido una medición objetiva de muchos parámetros de la movilidad de semen, ofreciendo observaciones más confiables, imparciales y repetibles, respecto al examen visual⁸. Muchos sistemas CASA están disponibles comercialmente, los cuales varían en su modo de funcionamiento, y en su habilidad para detectar y medir la movilidad de los espermatozoides de diferentes especies. La mayoría de sistemas CASA como los sistemas ISAS[®] (*Integrated Semen Analysis System*) o CEROS[®] (*Sperm Analyzer*) graban la trayectoria y el tipo de movimiento de los espermatozoides mediante una cámara de video; esta información es analizada matemáticamente para cada espermatozoide en cierto número de cuadros, y es expresada en forma numérica⁵¹; todo a través de una serie de variables como la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad lineal (VSL), el coeficiente lineal (LIN), y la frecuencia de desplazamiento de la cabeza (BCF), entre otras⁴⁵. Sin embargo, estas variables carecen de valores estándar definidos para lo que es normal y anormal en el movimiento del espermatozoide, y aún no se ha implementado una reglamentación internacional para los ajustes del equipo. Por tal razón, no se ha llegado a un acuerdo sobre los valores de los parámetros de análisis estándar dentro de una especie determinada, lo que dificulta la comparación de los resultados entre los laboratorios^{20, 22}. Adicionalmente en ausencia de una estandarización confiable y repetible de los parámetros seminales a evaluar en cada especie y de una lectura crítica de los resultados, las estimaciones arrojadas por este tipo de sistemas podrían conducir a valoraciones sesgadas de la calidad real de las muestras evaluadas, y de su relación con el potencial fertilizante del semen.

Existen otros dispositivos como el analizador de calidad de semen SQA[®] (*Sperm Quality Analyzer*), el cual registra las fluctuaciones en la densidad óptica de la luz que pasa a través de un capilar que a su vez contiene la muestra de semen. Estas fluctuaciones se registran en una celda fotométrica, y se convierten en una expresión numérica. Como tal, el SQA[®] no reconoce las células espermáticas durante el análisis. A diferencia de los sistemas CASA, el SQA[®] no requiere ajustes de los parámetros, por lo tanto se reduce una fuente potencial de sesgo²⁰. Hoogewijs *et*

*al.*²⁰, realizaron comparaciones entre el sistema SQA[®] y el sistema CASA, para evaluar la calidad del semen equino usando la microscopía óptica como método convencional de referencia. El SQA[®] fue altamente repetible al momento de evaluar la concentración de espermatozoides, con una buena correlación con la microscopía óptica. Sin embargo, los resultados para movilidad espermática fueron menos precisos. Por el contrario, el sistema CASA fue altamente reproducible y concordante con la microscopía óptica en la evaluación de movilidad total y progresiva de semen equino.

Kruger *et al.*²³, utilizando el método computarizado IVOS[®] (*Integrated Visual Optical System*; Hamilton Thorne Research), encontraron para la morfología normal y anormal del semen, una alta correlación ($r=0.85$) entre los resultados del equipo y los de un observador experimentado. Tejerina *et al.*⁵¹, determinaron que un nuevo sistema de análisis de la movilidad asistido por computador denominado *QualiSperm*[®], es un instrumento adecuado para establecer la movilidad y la velocidad de espermatozoides equinos, al igual que podría ser capaz de diferenciar sub-poblaciones de espermatozoides. Además, se ha observado que espermatozoides pertenecientes a distintas subpoblaciones responden de forma diferente ante procesos como la criopreservación o la exposición al efecto de agentes capacitantes, lo cual explica en cierta medida que la capacidad fecundante de un eyaculado no sea homogénea, y dependa de cada subpoblación espermática³⁵.

Con el avance tecnológico se han mejorado los sistemas CASA; un sistema reciente es el SCA[®] (*Sperm Class Analyzer*; *Microptic S.L.*), el cual fue comparado para la evaluación de semen humano, con el sistema IVOS[®], y con la evaluación convencional manual no computarizada (descrita por la OMS); encontrando que los resultados fueron comparables, independientemente de los diferentes grados de concentración del semen⁴⁴. El sistema SCA[®] también ha sido empleado para la evaluación de semen equino. En un estudio adelantado por Hidalgo *et al.*¹⁸, se realizó un análisis morfométrico de los espermatozoides de esta especie, evaluando la influencia de diferentes métodos de tinción (*Diff-Quik*, Hemacolor y Hematoxilina de Harris). Los resultados evidenciaron que el método de tinción con Hematoxilina puede ser considerado el más preciso para el sistema SCA[®], por el gran porcentaje de células analizables; para lo cual se concluyó que con solo 100

espermatozoides digitalizados adecuadamente por laminilla, es posible caracterizar morfológicamente la población completa de una muestra de semen equino.

Evaluación seminal por técnicas fluorescentes

El descubrimiento de una variedad de fluorocromos y de compuestos conjugados a sondas fluorescentes, ha permitido un análisis más amplio de los atributos de los espermatozoides¹⁴. La evaluación del semen equino por técnicas fluorescentes puede valerse de diferentes tecnologías para la visualización y cuantificación de la fluorescencia emitida por la célula y los compartimentos celulares. Las principales técnicas utilizadas son la microscopía de fluorescencia¹³, la fluorimetría¹⁶ y la citometría de flujo; esta última utilizada para evaluar un amplio número de características de integridad, vitalidad y función de los espermatozoides^{5, 14, 25}. Sin embargo, a pesar de que se ha reportado un gran número de estudios *in vitro* acerca de la utilización de este tipo de técnicas para reconocer diferentes componentes del semen equino, incluyendo la membrana plasmática, el acrosoma, las mitocondrias y una gran variedad de proteínas específicas, faltan investigaciones que asocien estos resultados *in vitro* con la fertilidad del macho equino³.

Evaluación de la integridad de la membrana plasmática

Nuevos procedimientos para la evaluación de la integridad de la membrana plasmática han sido reportados mediante el uso de las sondas fluorescentes como SYBR-14 y yoduro de propidio (PI). Ambos fluorocromos actúan mediante la penetración de la membrana espermática, y evalúan la integridad de la membrana del espermatozoide, marcando las células viables y las bombas iónicas funcionales. Comercialmente el kit de vitalidad espermática más comúnmente utilizado denominado *LIVE/DEAD* (Molecular Probes Inc.), combina dichos fluorocromos, eliminando la ambigüedad de su uso por separado^{14, 55}. SYBR-14 identifica a todos los espermatozoides en la muestra (vivos y muertos), mientras que el PI solo tiñe los núcleos de los espermatozoides muertos⁴⁶. Con esta combinación, el núcleo de los espermatozoides vivos fluoresce verde (SYBR-14), mientras las células degeneradas, las cuales han perdido la integridad de su membrana, se tiñen de

rojo¹⁴. Esta técnica ha sido utilizada en espermatozoides equinos^{13, 25}. En esta especie, el valor de referencia para el porcentaje de vitalidad espermática no ha sido establecido para ensayos clínicos. Se han reportado porcentajes de vitalidad mayores al 70% para semen fresco en equinos con fertilidad comprobada. Sin embargo, este porcentaje presenta una gran variabilidad de un individuo a otro⁵³.

Evaluación del acrosoma

El marcador de contenido acrosomal FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína) se une al contenido acrosomal de los espermatozoides de la especie humana y equina, luego de la permeabilización de la membrana plasmática, determinando así la presencia o ausencia de la matriz acrosomal. Con esta técnica se pueden identificar claramente dos patrones: el primero corresponde a los acrosomas que fluorescen completamente de color verde, indicando un acrosoma intacto; y el segundo como solo una banda fluorescente en el segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide, indicando la ocurrencia de la reacción acrosómica⁴⁶. Dicha reacción también puede observarse mediante otra técnica de tinción con lectinas combinadas que utiliza la sonda de fluorescencia FITC-PNA (aglutinina de maní conjugada con isotiocianato de fluoresceína)¹¹. El antibiótico fluorescente Clortetraciclina (CTC) también produce patrones fluorescentes que reflejan el estado acrosomal. La CTC puede ser usada en espermatozoides no fijados o fijados con glutaraldehído; sus patrones de fluorescencia varían entre especies, y ha sido probada en espermatozoides equinos^{38, 55}. El estado del acrosoma también puede ser determinado usando la sonda fluorescente acidotrópica *LysoTracker*[®] Green DND-26¹⁴.

Evaluación de la integridad del ADN

Varios métodos han sido utilizados para la evaluación de la integridad de la cromatina y la ruptura de las cadenas de ADN. El procedimiento de evaluación por citometría de flujo de la cromatina espermática (SCSA), utiliza el fluorocromo metacromático naranja de acridina, y evalúa la susceptibilidad a la desnaturalización de la cromatina de los espermatozoides tratados con ácido^{15, 55}. Este método ha sido empleado en espermatozoides equinos²⁶. Un aumento en la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización inducida, ha sido asociado con una reducción de la fertilidad en

machos equinos. Por el contrario, en ejemplares de alta fertilidad, se ha observado una menor generación de fluorescencia roja en las muestras seminales sometidas a esta técnica, indicando que la cromatina espermática es menos susceptible a la desnaturalización. Adicionalmente, se ha reportado que el método de SCSA, puede ser de gran ayuda para diferenciar diferentes grados de fertilidad en un mismo grupo de animales definidos como “fértiles”, siendo de gran utilidad para realizar clasificaciones de los sementales equinos cada vez más precisas en cuanto a esta característica ⁵³.

El ensayo cometa es un método basado en la electroforesis en gel, que puede ser usado para medir el daño del ADN en células eucarióticas individuales. Además, es versátil, relativamente simple de desarrollar y sensible, y aunque la mayoría de las investigaciones hacen uso de su capacidad para medir el rompimiento de ADN de cadena sencilla, modificaciones en este método permiten la detección de rompimientos de doble cadena del ADN, de entrecruzamientos, de daños de bases y de núcleos apoptóticos ³⁹. Linfor y Meyers ²⁴, utilizaron por primera vez el ensayo cometa en espermatozoides equinos, encontrando una correlación positiva ($r^2=0.92$) entre el daño del ADN de estas células, con el porcentaje de células con criodaño después de diferentes tratamientos de criopreservación. Wnuk *et al.* ⁵⁷, utilizaron en espermatozoides equinos una versión reciente del ensayo cometa, que se realiza en condiciones neutrales y que permite la detección de rompimientos de doble cadena en el ADN, independientemente de la presencia de rompimientos de cadena sencilla.

El método TUNEL corresponde a una de las técnicas más usadas mundialmente para la determinación de la fragmentación del ADN, mediante la marcación con deoxiuridina-trifosfato (dUTP) de los rompimientos de cadena sencilla y cadena doble en el ADN de los espermatozoides ¹⁰. Un método alternativo y recientemente implementado en semen equino es la prueba de dispersión de la cromatina del semen (SCD), la cual es una técnica eficiente para analizar la fragmentación del ADN de espermatozoides, y que se basa en la pérdida parcial de protaminas de la cromatina, lo cual se evalúa por microscopía de fluorescencia, discriminando entre los espermatozoides que producen un halo de dispersión de cromatina en la cabeza y aquellos que no presentan dicho halo, para lo cual se emplean como sondas fluorescentes

dibromo-4'-hidroximercurio-fluoresceína y yoduro de propidio ⁹.

Evaluación de la actividad mitocondrial

La polaridad es una medida del potencial de la membrana mitocondrial interna. Las diferencias en la magnitud del potencial de membrana, han sido relacionadas con los niveles de respiración, y la habilidad de estas organelas para participar en la regulación de la homeostasis del calcio ⁵⁴. El JC-1 (5,5', 6,6'- tetracloro-1,1', 3,3'-yoduro de tetra-etil-benzimidazolil-carbocianina) es un colorante fluorescente que se acumula en la mitocondria y que es conocido por su propiedad de discriminar entre células con un alto y un bajo potencial de membrana mitocondrial ².

Como está altamente relacionado con la tasa de respiración mitocondrial, el JC-1 puede ser usado como un indicador de actividad mitocondrial. A potenciales de membrana relativamente bajos (<100 mV), el JC-1 usualmente existe como un monómero con fluorescencia verde, detectado en el canal de isotiocianato de fluoresceína (FITC) de un microscopio de fluorescencia. Sin embargo cuando el potencial de membrana mitocondrial se incrementa (>140mV), los monómeros de JC-1 se multimerizan a una forma de arreglos denominados agregados J.

Con la multimerización de JC-1 comienza la emisión de fluorescencia máxima a longitudes de onda más largas, apareciendo en el canal de isocianato de rodamina (RITC) como barras intensas de fluorescencia naranja a roja.⁵⁴

Resultados de Gravance *et al.* ¹⁶, sugieren que mediante JC-1 es posible detectar de manera confiable y objetiva los cambios en el potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides equinos, tal como lo han demostrado investigaciones realizadas por Love *et al.* ²⁵, Brum *et al.* ⁵ y Gamboa *et al.* ¹³.

La función mitocondrial del espermatozoide también puede evaluarse utilizando colorantes fluorescentes vitales, como el *MitoTracker[®] Green*, el cual es fácilmente retenido en las mitocondrias con un alto potencial de membrana mitocondrial, generando un color verde fluorescente en la pieza intermedia del espermatozoide, mientras que la pieza intermedia de los espermatozoides con mitocondrias no funcionales, permanece sin coloración.

Evaluación de la estabilización lipídica de la membrana plasmática

La merocianina 540 es una técnica fluorescente útil en la evaluación de las alteraciones en la organización y arquitectura de los lípidos de la membrana plasmática, ya que se une a membranas que presentan una alta desestabilización lipídica, lo cual puede generarse debido a los cambios de temperatura a los que son sometidas las células espermáticas. Esta técnica ha sido utilizada en semen equino, en cuya evaluación se realiza un conteo de 200 células por eyaculado, encontrándose dos tipos: los espermatozoides fluorescentes indicando que presentan las membranas inestables (positivos para Merocianina 540) y los espermatozoides no fluorescentes con membranas estables ⁴⁶.

Evaluación de la capacitación espermática

La capacitación espermática consiste en una serie de alteraciones fisiológicas y funcionales en el espermatozoide, tales como aumento del calcio intracelular, la salida del colesterol de la membrana plasmática, el aumento en el pH del semen y la fosforilación de las proteínas ^{43, 46}. Esta última, puede ser evaluada por la detección de residuos de fosfotirosina en el semen, mediante inmunocitoquímica. Esta técnica permite la detección y localización de la proteína, utilizando anticuerpos específicos. En primer lugar un anticuerpo primario reconoce y se une al antígeno a detectar. Con el fin de visualizar la proteína mediante microscopía de fluorescencia se utiliza un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo que es específico para el anticuerpo primario. Como alternativa, el anticuerpo primario puede ser en sí fluorescente ⁴⁶. Este tipo de técnica ha sido empleada para evaluar y comparar los procesos de capacitación en el semen equino en fresco y post-descongelación ⁴³. La medición del flujo de calcio intracelular como indicador de la capacitación, se ha realizado también con la sonda fluorescente flou3-AM ³⁰.

Técnicas de evaluación de la capacidad fertilizante *in vitro*

La penetración del oocito por parte del espermatozoide está determinada por varios factores importantes, como una buena movilidad espermática, la integridad de los

receptores proteicos para una correcta unión con la zona pelúcida, y por lo tanto por la generación de una reacción acrosómica y por la unión a la membrana plasmática del oocito. De esta manera, se han desarrollado varias técnicas de penetración *in vitro*, que permiten la evaluación de los parámetros anteriores. Dichas técnicas tienden a ser consideradas como más cercanas al verdadero potencial fertilizante del semen, toda vez que involucran la interacción entre los gametos. Sin embargo, no se debe desconocer su desarrollo en condiciones *in vitro*, que obvian otras múltiples interacciones y efectos propios del tracto reproductivo de la hembra.

Prueba de unión a la zona pelúcida

Evalúa la movilidad de los espermatozoides, la zona de unión y penetración, la capacitación espermática y la reacción del acrosoma ²². Puede realizarse con partes de la zona pelúcida o con una zona pelúcida completa, evaluando la unión de los espermatozoides a la misma después de un periodo de tiempo ¹⁵. Esta técnica ha sido realizada en equinos y otras especies ³³. Meyers *et al.* ³³ evaluaron la unión de espermatozoides de tres equinos fértiles y tres equinos subfértiles a la zona pelúcida de ovocitos descongelados, encontrando que el número total de espermatozoides unidos a ZP fue mayor para los sementales fértiles ($p < 0.05$). Del mismo modo, el porcentaje de reacciones acrosómicas en espermatozoides unidos a ZP fue mayor en este grupo de animales ($p < 0.05$).

Ensayo hemizona

El ensayo hemizona (HZA) ha sido desarrollado como una prueba de diagnóstico para predecir el potencial de fecundación de los espermatozoides humanos. Fazeli *et al.* ¹² evaluaron la técnica con semen equino e investigaron una posible relación entre la fertilidad y el resultado de la HZA en esta especie. Los oocitos equinos son divididos en dos hemizonas, luego de ser desnudados y almacenados en solución salina a 4 °C hasta su uso. Posteriormente se evalúa la capacidad de unión de los espermatozoides a cada hemizona, pudiendo ser comparados. En este estudio se encontró una relación significativa entre el número de espermatozoides unidos a una hemizona determinada y los índices de fertilidad de cada reproductor, concluyéndose que la HZA puede ser utilizada como un parámetro útil en el análisis de semen equino. A pesar de esto, y del uso actual de HZA en humanos ¹ y en otras especies como porcinos ⁵², no

se conocen nuevos reportes de su aplicación en equinos.

Prueba de penetración de oocitos de hamster libres de zona pelúcida

Este ensayo desarrollado por Yanagimachi ⁵⁸, evalúa la capacidad de penetración del oocito por los espermatozoides que ya han sufrido la reacción del acrosoma ²². Padilla *et al.* ⁴⁰ realizaron esta prueba para semen equino fresco y almacenado a 4 °C durante 0, 24 y 72 horas. Los resultados indicaron que la prueba puede ser útil para mostrar una disminución en el potencial fertilizante de los espermatozoides equinos que han sido sometidos a un almacenamiento prolongado. Choi *et al.* ⁶, demostraron que oocitos bovinos libres de zona pelúcida pueden ser útiles para la evaluación *in vitro* de la capacitación y la fertilización de espermatozoides equinos. Se han desarrollado otros ensayos para evaluar la capacidad *in vitro* de los espermatozoides equinos para fertilizar oocitos, sin embargo las técnicas utilizadas no han sido repetibles ¹⁵.

Conclusiones

Existen diversos métodos dirigidas a estimar la fertilidad potencial del semen equino. Las técnicas convencionales de evaluación espermática siguen siendo de gran valor predictivo, ya que a pesar de proveer una apreciación indirecta de la capacidad fecundante, diferentes estudios las correlacionan positivamente con la tasa de preñez. Por otro lado, la adaptación y el mejoramiento de los protocolos de evaluación seminal empleados para la especie equina, y el desarrollo de novedosos métodos de diagnóstico ultraestructural, podrían conducir de forma más objetiva a predecir los resultados del uso del material seminal en procesos de biotecnología reproductiva. Sin embargo, aún se carece de estudios que correlacionen muchas de las técnicas recientes de evaluación seminal con el potencial fertilizante del semen equino.

Referencias

1. Abu D, Franken D, Hoffman B, Henkel R. Sequential analysis of sperm functional aspects involved in fertilization: a pilot study. *Andrología*, 2012; 44(1): 175-81.
2. Amaral A, Ramalho-Santos J. Assessment of mitochondrial potential: implications for the correct

monitoring of human sperm function. *International journal of andrology* 2010; 33: 180–186.

3. Ball B.A. Diagnostic Methods for Evaluation of Stallion Subfertility: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science* 2008; 28 (11): 650 - 665
4. Brito L, Greene L, Kelleman A, Knobbe M, Turner R. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology* 2011; 76:745–750.
5. Brum A, Sabeur K, Ball, B. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology* 2008; 69: 1041-1055.
6. Choi Y, Landim-Alvarenga F, Seidel JG, Squires L. Effect of capacitation of stallion sperm with polyvinylalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine zona-free or partially zona-removed equine oocytes. *J Anim Sci* 2003; 81: 2080-2087.
7. Cocchia N, Pasolinia M, Mancinib R, Petrazzuoloc O, Cristofarod I, et al. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2011; 75: 1201–1210.
8. Colenbrander B, Gadella B, Stout T. The predictive value of semen analysis in the evaluation of the stallion fertility. *Reprod Domest Anim* 2003; 38(4): 305-311.
9. Cortés-Gutiérrez E, Crespo F, Serres-Dalmau C, Gutiérrez de las Rozas A, Dávila-Rodríguez M, *et al.* Assessment of sperm DNA fragmentation in stallion (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*) using the sperm chromatin dispersion test. *Reprod Dom Anim* 2009; 44: 823-828.
10. Domínguez-Fandos D, Camejo M, Ballecà J, Oliva R. Human sperm DNA fragmentation: Correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry* 2007; 71A: 1011-1018.
11. Esteves S, Verza S. Relationship of *in vitro* acrosome reaction to sperm function: an update. *The Open Reproductive Science Journal* 2011; 3: 72-84.

12. Fazeli A, Steenweg W, Bevers M, Van den Broek J, Bracher V, *et al.* Relation between stallion sperm binding to homologous hemizona and fertility. *Theriogenology* 1995; 44(5): 751-60.
13. Gamboa S, Rodrigues A, Henriques I, Batista C, Ramalho-Santos J. Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology* 2010; 73(7): 950-958.
14. Gillan L, Evans G, Maxwell W. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 2005; 63(2): 445-457.
15. Graham J, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 2005; 64: 492-504.
16. Gravance C, Garner D, Baumber J, Ball B. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology* 2000; 53(9): 1691-1703.
17. Henry M, Snoeck P, Cottorello A. Post-thaw spermatozoa plasma integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology* 2002; 58: 245-248.
18. Hidalgo M, Rodriguez I, Dorado J, Sanz J, Soler C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet Med – Czech* 2005; 50(1): 24-32.
19. Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K, Sieme H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Anim Reprod Sci* 2011; 125: 112–118.
20. Hoogewijs M, De Vlieghe S, De Schauwer C, Govaere J, Smits K, *et al.* Validation and usefulness of the Sperm Quality Analyzer V equine for equine semen analysis. *Theriogenology* 2011; 75: 189-194.
21. Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology*. 2005; 63(5):1354–1365.
22. Katila T. *In vitro* evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review. *Acta vet scand* 2001; 42(2): 199-217.
23. Kruger T, Du Toit T, Franken D, Menkveld R, Lombard C. Sperm morphology: Assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS. *Fert Steril* 1995; 63: 134-141.
24. Linfor J, Meyers S. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. *J. Androl* 2002; 23(1):107-113.
25. Love C, Thompson J, Brinsko S, Rigby S, Blanchard T, *et al.* Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology* 2003; 60(6): 1127-1138.
26. Love, C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. Volume 89, Issues 1–4, October 2005, Pages 39–45.
27. Love C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology* 2011; 76: 547–557.
28. Macpherson M. How to Evaluate Semen in the Field. *AAEP Proceeding* 2001; 47: 412-416.
29. Madeiros A, Gomes G, Carmo M, Papa F, Alvarenga M. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 2002; 58: 273-276.
30. Magistrini M, Guitton E, Levern Y, Nicolle J, Vidament M, *et al.* New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology* 1997; 48: 1229-1235.
31. Mansour M. Modification of hypo-osmotic swelling test to evaluate the integrity of stallion sperm plasma membrane. *Global Veterinaria* 3 (4): 302-307, 2009
32. Mantovani R, Rota A, Falomo M, Bailoni L, Vincenti L. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reprod. Nutr. Dev* 2002; 42(3): 217–226.

33. Meyers S, Liu I, Overstreet J, Vadis S, Drobnis E. Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa: Comparisons between fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 1996; 46: 1277-1288.
34. Mocé E. and Graham, J.K. *In vitro* evaluation of sperm quality Original research article. *Animal Reproduction Science* 2008; 105 (1-2) 104-118.
35. Muiño R., Rivera M.M, Rigau T., Rodríguez-Gil J.E, Peña A.I. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Animal Reproduction Science* 2008; 109 (1-4): 50 - 64
36. Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M. *et al.* Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 51: 721-727.
37. Neild D, Chaves M, Flores M, Miragaya M, Gonzalez E, *et al.* The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrología* 2000; 32(6): 351-355
38. Neild D, Gadella B, Chavez M, Miragaya M, Colenbrander B, *et al.* Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 2003; 59: 1693 - 1705
39. Olive P, Banáth J. The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols* 2006; 1(1): 23-29.
40. Padilla A, Tobback C, Foote R. Penetration of frozen-thawed, zona-free hamster oocytes by fresh and slow-cooled stallion spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 1991; 44: 207-212.
41. Perez-Osorio J, Mello F, Juliani G, Lagares M, Lago L, *et al.* Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures. *Anim. Reprod* 2008; 3/4(5): 103-109.
42. Pesch S, Bostedt H, Failing K, Bergmann M. Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. *Anim Reprod Sci* 2006; 91: 285-298.
43. Pommer A, Rutllant J, Meyers S. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol Reprod* 2003; 68: 1208-1214.
44. Proctor J, Boone W, Higdon H. Comparison of the manual, IVOS, and SCA methods for semen analysis reporting. *The Journal of Clinical Embryology* 2009; 12(4): 5-7.
45. Quintero-Moreno A, Miro J, Rigau T, Rodríguez-Gil J. Identification of sperm subpopulation with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 2003; 59: 1973-1990.
46. Ramalho-Santos J, Amaral A, Sousa A, Rodrigues A, Martins L, *et al.* Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* 2007; 394-402.
47. Ramu S, Jeyendran R. The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. *Methods Mol Biol.* 2013;927:21-25.
48. Salazar J, Teague S, Love C, Brinsko S, Blanchard T, Varner D. Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology* 2011; 76(3):409-418.
49. Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, *et al.* Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reprod Dom Anim* 2003; 38:134-140.
50. Squires EL, Keith SL, Graham JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2004; 62: 1056-1065.
51. Tejerina F, Morrell J, Petterson J, Dalin A, Rodríguez-Martinez H. Routine assessment of motility of ejaculated stallion spermatozoa using a novel computer-assisted motility analyzer (Qualisperm™). *Anim Reprod* 2009; 6(2): 380-385.
52. Tsakmakidis I, Lymberopoulos A, Khalifa T. Selectivity of porcine zona pellucida to bind spermatozoa with normal chromatin structure. *Andrología*, 2011; 43(5):358-60.

53. Turner R.M. Current techniques for evaluation of stallion fertility original research article. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2005; 4 (3): 257-268
54. Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: Engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 2004; 128: 269-280.
55. Varner D. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 2008; 70(3): 448-462.
56. Villa N, Castaño D, Duque P, Ceballos A. Actividad de la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa en sangre y plasma seminal en caballos colombianos. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2012; 25: 64-70
57. Wnuk M, Lewinska A, Oklejewicz B, Bartosz G, Tischner M. *et al.* Redox status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude of DNA damage in sperm cells. *Theriogenology* 2010; 74(9): 1677-1684.
58. Yanagimachi R. Penetration of guinea pig spermatozoa into hamster eggs *in vitro*. *J Reprod Fétil* 1972; 28: 477-480.