

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



TESIS DOCTORAL

**Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino
para los procesos de conservación seminal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Luna Gutiérrez Cepeda

Directora

Consuelo Serres Dalmau

Madrid, 2014

**OPTIMIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE
ACONDICIONAMIENTO DEL SEMEN EQUINO
PARA LOS PROCESOS DE CONSERVACIÓN SEMINAL**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
VETERINARIA

Luna Gutiérrez Cepeda
Dpto. Medicina y Cirugía Animal
Facultad de Veterinaria, UCM
Madrid, 2013

" Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas."

Marie Curie



Foto Tim Flach

*" Vivir no es sólo existir,
sino existir y crear,
saber gozar y sufrir
y no dormir sin soñar.
Descansar, es empezar a morir."*
Gregorio Marañón

Foto Portada Tim Flach



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
VETERINARIA

OPTIMIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE
ACONDICIONAMIENTO DEL SEMEN EQUINO
PARA LOS PROCESOS DE CONSERVACIÓN
SEMINAL

Tesis doctoral presentada para la obtención del Grado de Doctor.
Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid, 2013

Luna Gutiérrez Cepeda

Dpto. Medicina y Cirugía Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid

Directora de tesis:

Dra. Consuelo Serres Dalmau

Foto Tim Flach



A Cuca, por facilitarme un camino lleno de relinchos.....

AGRADECIMIENTOS

Lo he tenido muy claro aún cuando acabar de escribir esta tesis parecía lejano. Siempre nos han sobrado las palabras, pero sabía que estas páginas (y sus letras) irían dedicadas especialmente a ti. Una de las lecciones más importantes que he aprendido en lo que llevo de vida es entender que los sentimientos deben compartirse. Así que, a pesar de que nos hayamos dicho muchas cosas entre silencios, hoy quiero darte las gracias.

No creo que sea fácil entender a una persona, aún menos cuando la conoces poco, y tu lo hiciste (no sé si conscientemente) desde el principio. Creo que lograste la forma más acertada de sacar lo mejor de mi. Tu trato de igual me ha hecho querer dar más, y siempre he sentido confianza, y no hay mejor motor que ese para proponerse llegar lejos (al menos es así en mi caso). Gracias por compartir conmigo tu pasión por la repro, enseñarme y hacer que aprendiera. Por aguantarme y crecer conmigo. Al final, con alguna de mis extravagancias hemos conseguido cosas buenas, ¿no?. Te has convertido en mucho más que "una jefa". Sinceramente, no creo que pudiera haber tenido una directora mejor. No sé si hago bien escribiéndolo aquí, pero creo que hacemos un buen equipo. Nos retroalimentamos de forma positiva.

Me llevo muchas cosas buenas de este periodo pero, sin duda, una muy importante es haberte ganado como amiga. Gracias Cuca.

Julio, se que no te gusta que te de las gracias, así que no lo voy a hacer. Pero quiero que sepas que tu tesón, tu fuerza, tus ganas, tu apoyo y tu sonrisa me han ayudado a ser quien soy y estar hoy aquí. Para mí eres un ejemplo de docente y de persona.

Gracias a todas las sonrisas de la Facultad y del Hospital. Vicen (tengo claro que eres una de las grandes estrellas de esta Luna), Marcelo, Teo (me cuidas como una mami), Sara (tienes tanto corazón como carácter, y eso es mucho), Mari Ángeles, Alvarito (eres nuestro propio Dr. Shepherd), Paloma, Fina (mi yin, hemos creado un camino), Conchita, María (finalizamos un ciclo a la vez. Gracias por tu ayuda cuando estaba perdida), Antonio, Mariví... A todos esos “buenos días” que alegran el día, no me cabéis todos aquí. A los resis pasados y presentes y los alumnos internos (todos aprendemos de todos). A los dos tesoros que encontré entre los libros de anato y las prácticas de bioquímica (Letto y Monse), siempre habéis creído en mi y sois, sin duda, uno de los mejores regalos de la carrera (la de los libros y la de la vida).

A mi familia, que desde que me empeñé en dormir la siesta entre los cascotes de un caballo me han apoyado. Sois un puerto y para alguien como yo para quien la vida es un océano eso es muy importante. Abuelita, se que a ti te haría especial ilusión verme “doctora” así que este título va dedicado a ti (espero que las neuronas restablezcan una conexión mágica y te dejen entenderlo).

A “la otra rubia”, Rosalía, eres uno de los grandes regalos de este periodo. Por cierto, mi viaje de “fin de tesis” va a ser a Nueva Zelanda, ¿te suena?. Te necesitamos. Hay doce horas de diferencia horaria y con el *whatsapp* no vamos a coincidir. No puedes negarte, está escrito en una tesis (puedes referenciarme).

A mi otra gran familia, que son mis amigos. Prometo que he intentado no daros “la coña” demasiado con mi tesis y espero haberlo logrado. Sois una parte enorme de mi vida. No cabéis todos aquí (afortunadamente hay un largo etc.) pero siempre intento que la gente especial sepa que lo es (vosotros sabéis quiénes sois). A Cris (mi estrella canaria), Cori (sólo por dictarme esas largas series de números esta tesis también es tuya), Miriam (mi CoCo, tu estarás presente aquí y en todo), Laurita (al final va todo de caballos), a mi hermanita Sandra, a la flor que es Fresia... A mis músicos por poner la banda sonora (Rash, Marwan, Miki, Andrés, Lucas, Mario...), ya que no puedo ponerlos en la dedicatoria de mi disco estáis en la de mi tesis.

A toda la gente que ha ayudado y apoyado en el desarrollo de este trabajo. A todo el equipo del “Depósito de Sementales de Ávila”, en especial a Paco, que me ha brindado siempre una mano y a Juan Carlos (eres una gran persona y un magnífico profesional. Los grandes maestros son aquellos que siempre están dispuestos a enseñar). A Pedro Cuesta por ayudarme a ponerle “sentido estadístico” a los números y a Miguel Ángel Ramírez por pegarse las palizas de procesado de muestras de 100 en 100 conmigo.

A Tim Flach por permitirme, sin conocerme y de forma altruista, utilizar su magia expresada en píxeles.

A los caballos. Una de las grandes razones de que esté aquí, son ellos.

STAY OPEN

TESIS DOCTORAL

La Tesis Doctoral "Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal" es un compendio de publicaciones:

- **ARTÍCULO 1: Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure.** Luna Gutiérrez-Cepeda, Álvaro Fernández, Francisco Crespo, Jaime Gosálvez, Consuelo Serres. *Animal Reproduction Science* 2011, 124(1-2):85-89.
- **ARTÍCULO 2: Colloidal centrifugation of stallion semen results in a reduced rate of sperm DNA fragmentation.** Francisco Crespo, Luna Gutiérrez-Cepeda, Jaime Gosálvez, Consuelo Serres y SD Johnston. *Reproduction in Domestic Animals* 2013, 48(2):23-25.
- **ARTÍCULO 3: The effect of two pre-cryopreservation single layer colloidal centrifugation protocols in combination with different freezing extenders on the fragmentation dynamics of thawed equine sperm DNA.** Luna Gutiérrez-Cepeda, Álvaro Fernández, Francisco Crespo, Miguel Ángel Ramírez, Jaime Gosálvez y Consuelo Serres. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2012, 54:72.
- **ARTÍCULO 4: Equine sperm cryopreservation efficiency optimization by colloidal centrifugation.** Luna Gutiérrez-Cepeda, Consuelo Serres, Álvaro Fernández, Jaime Gosálvez, Juan Carlos Blázquez y Francisco Crespo. *Reproduction in Domestic Animals* (enviado).

Además el trabajo de investigación desarrollado durante este tiempo, ha contribuido en el desarrollo de otras publicaciones y en la participación en diversos congresos nacionales e internacionales con la presentación de comunicaciones orales y pósters:

➤ **Fertility Rates In Jennies By New Semen Processing Techniques.**

Consuelo Serres, Luna Gutiérrez-Cepeda, Sara Gero, Virginia Gómez, Juan Carlos Blázquez y Francisco Crespo. *Journal of Equine Veterinary Science 2013 (ACEPTADO)*.

➤ **I Congreso de Medicina Veterinaria de Asininos** Vila Real,

Portugal. Noviembre 2012 Póster: *“To improvement of fertility rates in jennies by new semen processing techniques”*. Consuelo Serres, Luna Gutiérrez-Cepeda, Sara Gero, Virginia Gómez, Juan Carlos Blázquez y Francisco Crespo.

➤ **6th International Symposium on Stallion Reproduction (ISSR).**

Vienna, Austria. Septiembre, 2012. Comunicación corta: *“Colloidal Centrifugation of Stallion Semen Results in a Reduced Rate of Sperm DNA Fragmentation”*. Francisco Crespo, Jaime Gosálvez, Luna Gutiérrez-Cepeda, Consuelo Serres y JD Johnston. *Reproduction in Domestic Animals*, 2013, 48(2), 23-25.

- **Congreso: XII Congreso de Veterinaria Militar y VI Jornadas de Historia de la Veterinaria Militar.** Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Madrid. Junio, 2011. Comunicación oral: *“Selección espermática equina mediante centrifugación. ¿Centrifugación simple o centrifugación con coloides?”* Francisco Crespo, Luna Gutiérrez-Cepeda, Jaime Gosálvez y Consuelo Serres.
- **Aumento De La Fertilidad Mediante Técnicas De Procesamiento Avanzado De Semen: Caso Clínico”.** Miriam Ayuso-Hernando, Luna Gutierrez-Cepeda, María Villalva y Consuelo Serres. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2011, 5(2):36-48.*
- **II Congreso Argentino de Reproducción.** Mendoza, Argentina. Mayo, 2011. Comunicación Oral y Póster: *“Colloidal versus Simple Centrifugation”.* Luna Gutiérrez-Cepeda, Francisco Crespo, Jaime Gosálvez, Consuelo Serres. Publicado en el libro de resúmenes del congreso.
- **Tercer Curso sobre Medicina Reproductiva, Transferencia Embrionaria y Neonatología Equinas.** Córdoba, España. Noviembre, 2010. Comunicación Oral: *“Más allá de las técnicas tradicionales de procesamiento y evaluación seminal: Centrifugación coloidal e integridad de la cromatina espermática en la criopreservación de semen equino. Resultados preliminares”* Luna Gutiérrez-Cepeda, Álvaro Fernández, Francisco Crespo, Miguel Ángel Ramírez y Consuelo Serres, .

- **Segundo Curso sobre Medicina Reproductiva, Transferencia Embrionaria y Neonatología Equinas.** Córdoba, España. Octubre, 2009. Comunicación Oral: *“¿Por qué una prueba de congelación?”*
Luna Gutiérrez-Cepeda y Consuelo Serres.

TABLA DE CONTENIDOS

	CAPÍTULO 1: RESUMEN/SUMMARY	27
	CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN	45
1	Criopreservación de Semen Equino, Variabilidad Individual y Prueba de Congelación	45
2	Mecanismos de Criolesión en el Semen Equino	50
2.1	<u>Estrés Osmótico</u>	50
2.2	<u>Estrés Térmico</u>	51
2.3	<u>Estrés Oxidativo</u>	52
2.4	<u>Apoptosis</u>	53
3	Evaluación Seminal	54
3.1	<u>Evaluación del Volumen Espermático</u>	55
3.2	<u>Evaluación del Color y Aspecto del Eyaculado</u>	55
3.3	<u>Evaluación de la Concentración Espermática</u>	
3.3.1	Métodos de Evaluación de la concentración espermática:	56
3.3.1.1	<i>Cámara de conteo o Hemocitómetro</i>	56
3.3.1.2	<i>Densímetro o Espectrofotómetro calibrado para semen equino</i>	56
3.3.1.3	<i>Contadores celulares electrónicos</i>	57
3.3.1.4	<i>Análisis Espermático Asistido por Ordenador (CASA: Computer Assisted Sperm Analysis)</i>	57
3.4.	<u>Evaluación de la Motilidad Espermática</u>	57
3.4.1	Métodos de Evaluación de la Motilidad Espermática:	58
3.4.1.1	<i>Evaluación Subjetiva bajo microscopio (Evaluación Visual)</i>	58
3.4.1.2	<i>Evaluación Objetiva mediante Evaluación de la Movilidad Espermática</i>	59
3.4.1.3	<i>Evaluación Objetiva mediante Analizador de Calidad Espermática</i>	59
3.4.1.4	<i>Evaluación Objetiva mediante Análisis Espermático Asistido por Ordenador o Sistema Computerizado CASA</i>	60
3.5	<u>Evaluación de la Morfología Espermática</u>	62
3.5.1	Métodos de Evaluación de la Morfología Espermática:	64
3.5.1.1	<i>Preparaciones teñidas fijadas en portaobjetos</i>	64
3.5.1.2	<i>Preparaciones húmedas sin teñir</i>	65
3.6	<u>Evaluación de la Vitalidad Espermática</u>	65
3.6.1	Métodos de evaluación de la integridad de las membranas espermáticas:	65
3.6.1.1	<i>Uso de tinciones no fluorescentes (Tinciones Supravitales)</i>	65
3.6.1.2	<i>Uso de Tinciones Fluorescentes</i>	66

3.6.1.3	<i>Test Hiposmótico (HOST, Hipoosmotic Swelling Test)</i>	67
3.7	<u>Evaluación de la Cromatina Espermática</u>	68
3.7.1	Métodos de evaluación de la fragmentación de la cromatina espermática:	70
3.7.1.1	<i>Terminal dUTP Nock-End Labeling (Ensayo TUNEL)</i>	71
3.7.1.2	<i>Técnica In Situ Nick Translation (ISNT)</i>	71
3.7.1.3	<i>DNA Breakage Detection-Fluorescence in situ Hybridization (Técnica DBD-FISH)</i>	72
3.7.1.4	<i>Ensayo Cometa</i>	72
3.7.1.5	<i>Evaluación de la Estructura de la Cromatina Espermática, Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)</i>	73
3.7.1.6	<i>Evaluación de la Dispersión de la Cromatina Espermática, Sperm Chromatin Dispersion (SCD)</i>	74
4	Procesado de Congelación en Semen Equino	77
4.1	<u>Dilución y Centrifugación</u>	77
4.2	<u>Adición del diluyente de congelación: Crioprotectores y Diluyentes</u>	80
4.2.1	Crioprotectores:	80
4.2.1.1	<i>Crioprotectores No Permables</i>	81
4.2.1.1.1	Azúcares	81
4.2.1.1.2	Leche Desnatada	82
4.2.1.1.3	Yema de Huevo	82
4.2.1.2	<i>Crioprotectores Permeables</i>	83
4.2.1.2.1	Glicerol	83
4.2.1.2.2	Crioprotectores Permeables Alternativos	85
4.2.2	Diluyentes de congelación:	82
4.3	<u>Equilibrado, refrigeración, congelación y almacenamiento</u>	91
4.3.1	Sistemas de Congelación:	93
4.3.1.1	<i>Sistema Convencional en Nitrógeno Líquido</i>	93
4.3.1.2	<i>Sistema automatizado de Congelación</i>	94
4.3.1.3	<i>Otros Sistemas de Congelación</i>	94
4.4	<u>Envasado</u>	95
4.5	<u>Descongelación</u>	95
6	Técnicas de Selección Espermática	96
6.1	<u>Técnica de Migración Espermática</u>	96
6.2	<u>Técnicas de Adherencia Espermática (Filtración)</u>	97
6.3	<u>Técnicas de Centrifugación Coloidal (CC)</u>	98
	CAPÍTULO 3: OBJETIVOS	107
	CAPÍTULO 4: ARTÍCULO 1	111
	CAPÍTULO 5: ARTÍCULO 2	119

	CAPÍTULO 6: ARTÍCULO 3	125
	CAPÍTULO 7: ARTÍCULO 4	135
	CAPÍTULO 8: DISCUSIÓN	175
1	Artículo 1	175
2	Artículo 2	179
3	Artículo 3	183
4	Artículo 4	188
5	Variabilidad Individual	193
6	Beneficios del Uso de Coloides en la clínica reproductiva equina	196
	CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES	195
	CAPÍTULO 10: ABREVIATURAS	205
	CAPÍTULO 11: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	209

CAPÍTULO 1: RESUMEN

Desde hace muchos años en las técnicas de reproducción asistida en medicina humana existen protocolos de procesamiento de semen para incrementar su calidad. En la industria reproductiva equina, las técnicas de inseminación artificial se han desarrollado ampliamente, aunque el uso de semen criopreservado es menor que en otras especies debido a problemas de supervivencia espermática y variabilidad individual. Esta variabilidad individual también ha sido establecida entre razas. En general, sólo el 20-30% de los sementales producen un semen con buena capacidad de congelación, "*buenos congeladores*", otro 40-60% aproximadamente con capacidad aceptable (aunque se ve afectado negativamente por la criopreservación) y otro 20-30% de sementales producen semen que no es congelable en absoluto, "*malos congeladores*". Estas limitaciones determinan que la inseminación artificial con semen congelado en el équido esté menos extendida que en otras especies y encontrar sistemas y procedimientos que permitan incrementar el número de sementales y eyaculados adecuados para refrigeración y/o congelación es una de las metas principales.

Unos de los procedimientos más extendidos para intentar mejorar la calidad seminal en equinos, especialmente en individuos tipificados como "malos refrigeradores-congeladores", es la eliminación de parte del plasma seminal mediante

centrifugación simple. Sin embargo, esta técnica no ejerce tareas de selección, sino que concentra tanto los espermatozoides considerados normales, anormales y los no viables en el “pellet” resultante.

La centrifugación coloidal es una técnica útil que ha demostrado mejorar también la calidad seminal en diferentes especies animales, entre ellas los caballos, al seleccionar los mejores espermatozoides y eliminar agentes patógenos, células inflamatorias y espermatozoides muertos responsables de la liberación de especies oxígeno reactivas (ROS) que disminuyen la calidad seminal. Su uso está recomendado para mejorar la fertilidad de sementales infértiles.

Sin embargo, los protocolos de centrifugación coloidal inicialmente recomendados por los fabricantes eran clínicamente difíciles de incorporar a las técnicas de procesamiento del semen equino ya que usaban volúmenes de centrifugación pequeños (2-5ml de semen diluido, 1:1) y un gran volumen de coloide. Teniendo en cuenta que el volumen normal de eyaculado en los sementales es de 40-150ml, era necesario el uso de 16-60 tubos de centrifugación de 50ml y entre 160-600ml de colide lo que era clínicamente no factible debido a dificultades técnicas y económicas.

Por ello, nuestro primer objetivo fue determinar el protocolo de procesado óptimo para adaptar a la clínica reproductiva equina el uso de un producto de centrifugación coloidal (Equipure®). Se recolectaron un total de diecinueve eyaculados de diez sementales Pura Raza Española (P.R.E.). Los eyaculados, sin la fracción gel, se analizaron antes del tratamiento (control). El semen fue sometido a

seis protocolos de centrifugación coloidal y las muestras resultantes fueron evaluadas estadísticamente ($p < 0.05$) para recuperación y calidad espermática. Los valores del índice de linearidad (LIN), rectitud (STR) y la frecuencia de batida (BCF) fueron significativamente mayores en los protocolos de centrifugación coloidal respecto al protocolo control y el índice de fragmentación del ADN tendió a ser menor en la mayoría de los protocolos de centrifugación coloidal. Los protocolos de centrifugación coloidal propuestos resultaron ser tan eficientes en la mejora de la calidad espermática como el protocolo de centrifugación mediante gradientes recomendado por la casa comercial, con la ventaja añadida de que estos son mucho más económicos y sencillos de utilizar. De acuerdo a los resultados, es posible incorporar protocolos de centrifugación coloidal monocapa y/o con grandes volúmenes de semen, que resultan sencillos, económicos y compatibles clínicamente con las técnicas de procesado de semen equino.

Una vez adaptados los protocolos de centrifugación coloidal a la clínica equina, comparamos el efecto de la centrifugación simple y la centrifugación coloidal en semen fresco sobre las características seminales del semen no centrifugado y de los pellets resultantes de las centrifugaciones en diecisiete eyaculados de seis sementales P.R.E. Inmediatamente tras la centrifugación coloidal la velocidad rectilínea (VSL) de los espermatozoides recuperados fue mayor que tras la centrifugación simple ($p = 0.000$), pero no obtuvimos diferencias significativas en la motilidad progresiva ni en los niveles de fragmentación del ADN espermático determinados a través del Test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD). Sin embargo, al evaluar la dinámica de la fragmentación del

ADN, incubando las muestras a 37°C durante 24 horas, se determinó que la tasa de fragmentación del ADN espermático (r-SDF) fue menor ($p=0.0011$) en aquellos espermatozoides recuperados tras la centrifugación coloidal respecto a las no centrifugadas o sometidas a centrifugación simple. Estos resultados determinan que la centrifugación coloidal del semen equino prolonga la longevidad del ADN espermático, aunque es importante resaltar que estas diferencias fueron sólo visibles tras la incubación de las muestras. Por ello, recomendamos que a la hora de valorar técnicas de centrifugación y/u otros procedimientos ex vivo se utilice la evaluación de la dinámica de la fragmentación, ya que permite la expresión del daño latente en la cromatina espermática, que no siempre es visible inmediatamente tras la eyaculación o el procesado.

Posteriormente comenzamos a evaluar la aplicación de esta técnica a los procesos de conservación seminal, evaluando el efecto de dos protocolos de centrifugación coloidal monocapa aplicados antes de la criopreservación del semen equino, en combinación con tres diluyentes de congelación comerciales, sobre la dinámica de fragmentación del ADN espermático. Los niveles de fragmentación del ADN espermático fueron significativamente menores ($p<0.05$) nada más descongelar y tras 4 horas de incubación a 37°C en las muestras sometidas a cualquiera de los dos protocolos de centrifugación coloidal respecto a las muestras control (centrifugación simple). El diluyente InraFreeze® se asoció a niveles de fragmentación del ADN espermático menores que el diluyente BotuCrio® a las 6 horas de incubación, y que los diluyentes Gent® y BotuCrio® a las 24 horas de incubación. Estos resultados sugieren que la centrifugación

coloidal monocapa, con semen puro o diluido, aplicada antes de la criopreservación reduce el índice de fragmentación durante las primeras 4 h en el semen descongelado. Se necesitan más estudios para determinar la influencia de los diluyentes de congelación sobre la fragmentación del ADN espermático equino.

A la vista de los resultados obtenidos, evaluamos la incorporación de la centrifugación coloidal monocapa antes del procesado de criopreservación dentro de la “Prueba de Congelación”, valorando la influencia del tipo de centrifugación y del diluyente utilizado sobre la calidad seminal postdescongelación. Se estudiaron un total de diecisiete eyaculados. Aquellos cuya motilidad progresiva en fresco era $\geq 60\%$ eran clasificados como “Adecuados para la Congelación” y procesados de forma estándar para la Prueba de Congelación (centrifugación simple). Los eyaculados cuya motilidad progresiva en fresco era $< 60\%$ se clasificaban como “No Adecuados para la Congelación” y se sometían a dos protocolos de centrifugación coloidal. Si tras la centrifugación coloidal su motilidad progresiva era $\geq 60\%$ se clasificaban como “Aceptados tras la Centrifugación Coloidal” y eran incluidos en la Prueba de Congelación, sino alcanzaban este valor no eran procesados. En todas las muestras que fueron criopreservadas se utilizaron tres protocolos, cada uno con un diluyente de congelación diferente y comúnmente utilizado en la industria reproductiva equina (Lactosa-EDTA modificado, InraFreeze® y Botu-Crio®).

La incorporación de la centrifugación coloidal antes de la criopreservación permitió incrementar del 35% (6/17) al 71% (12/17) el porcentaje de eyaculados disponibles para la congelación, duplicando el número de muestras

criopreservadas. Sólo encontramos diferencias significativas ($p < 0.05$) en LIN y en la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) a los cinco minutos de incubación a 37°C tras la descongelación entre las muestras procesadas con centrifugación coloidal y simple. No se encontraron diferencias significativas en las variables analizadas entre los dos protocolos de centrifugación coloidal. El uso de la centrifugación coloidal antes de la criopreservación permitió que a partir de eyaculados de mala calidad se obtuvieran dosis de semen descongelado de calidad similar a la de los eyaculados de buena calidad en fresco. El diluyente comercial BotuCrio® fue el que optimizó de manera más eficiente todos los parámetros de motilidad y sus características. La centrifugación coloidal optimizó la eficiencia de la técnica de congelación seminal al incrementar el número de sementales y/o eyaculados criopreservables de cada semental.

Incluir las nuevas técnicas de procesamiento de semen mediante coloides a los procesos de conservación, específicamente en la Prueba de Congelación, podría ayudar a optimizar los protocolos de criopreservación de semen en esta especie, particularmente al enfrentarse a individuos o razas cuya baja calidad espermática inicial limita o impide su inclusión en los programas comerciales de criopreservación.

De la presente investigación “Optimización de las técnicas de procesamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal” se desprenden las siguientes conclusiones:

- 1. Es posible aplicar protocolos de centrifugación coloidal de una sola capa y con grandes volúmenes de semen sin que se vea afectada negativamente la selección espermática de la centrifugación con gradientes; haciéndola compatible técnica y económicamente en la práctica de la clínica equina.
- 2. La dinámica de la fragmentación del ADN ocurre de forma más lenta y menos intensa tras la centrifugación coloidal respecto al semen fresco no procesado y respecto al semen fresco procesado mediante centrifugación simple.
- 3. La centrifugación coloidal previa a la congelación del semen permite obtener muestras de semen descongelado con mayor integridad del ADN manteniendo en el tiempo un índice de fragmentación menor.
- 4. La evaluación dinámica de la fragmentación del ADN permite la expresión del daño latente en la cromatina espermática, que no siempre es visible inmediatamente tras la eyaculación o el procesado.

- 5. El diluyente de congelación InraFreeze® presenta una dinámica de fragmentación del ADN más lenta que el diluyente BotuCrio® y el Gent®. El diluyente Botucrio® mantiene mejores características de la motilidad espermática que el diluyente InraFreeze® y el Lactosa-Edta.

- 6. El caballo de Pura Raza Española puede ser considerado una raza de baja calidad seminal, en relación al alto porcentaje de animales con una motilidad progresiva menor al 50%.

- 7. Al incluir la centrifugación coloidal en una Prueba de Congelación clínica, el protocolo que incorpora 10ml de semen diluido sobre 10ml del coloide fue más efectivo que el protocolo que incluye 5ml de semen puro sobre 5ml del coloide.

- 8. La centrifugación coloidal permite obtener, a partir de eyaculados de peor calidad, dosis de semen descongelado de calidad similar a la de los eyaculados de buena calidad.

- 9. La incorporación de la centrifugación coloidal en la Prueba de Congelación incrementa el número de sementales y/o eyaculados adecuados para los programas de congelación comerciales, optimizando la técnica.

CAPÍTULO 1: SUMMARY

For many years in human assisted-reproduction procedures there have been special protocols to prepare and improve sperm quality. In the equine industry, artificial insemination techniques have been greatly developed, although cryopreserved semen is still less used comparing to others species due to spermatoc survival problems and individual variability. This individual variability has also been established between breeds. In general, 20-30% of stallions are considered to have a good frozen-thawed sperm quality “Good Freezers”, 40-60% average frozen-thawed quality and the other 20-30% are not suitable for cryopreservation “Bad Freezers”. All these limitations determine that artificial insemination with frozen semen in the equine is less widespread than in other species and finding systems and procedures to increase the number of stallions and ejaculates suitable to be cooled and cryopreserved is an important goal.

It has been suggested that equine sperm quality could be enhanced, particularly in stallions identified as “bad coolers/freezers”, by removing some of the seminal plasma by simple centrifugation. However, such procedure does not select the best spermatozoa as all sperm and debris are presented in the resulting pellet.

Contrary, colloidal centrifugation is a useful technique that has been proved to enhance semen quality by selection of the best spermatozoa for different species, including the stallion, and removal of bacteria, inflammatory cells and death spermatozoa that may be responsible for some of the spermatozoa sublethal damage and serve as a source of reactive oxygen species (ROS). Its use is recommended to improve fertility of subfertile stallions.

However, colloidal centrifugation protocols first recommended by the manufacturer were clinically complicated in the equine sperm processing technique as they used low centrifugation volumes (2-5ml extended semen, 1:1) and a high quantity of centrifugation product. Considering that the normal ejaculate volume ranges between 40 and 150ml, we were expected to use between 16 and 60 centrifuge tubes (50ml) and 160-600ml of centrifugation product what was clinically not viable due to the cost and technical difficulties inherent to the process.

Therefore, our first aim was to determine the optimal processing procedures to adapt the use of a colloidal centrifugation product (EquiPure™) in the equine reproduction industry. A total of nineteen ejaculates were collected from 10 Purebred Spanish Horses (P.R.E horses) using a Missouri artificial vagina. Gel-free semen aliquots were analyzed prior to treatment (control). Semen was subjected to one of six colloidal centrifugation protocols and resulted samples were statistically evaluated ($p < 0.05$) for sperm quality and recovery rate. We obtained higher values by colloidal centrifugation in the Linearity (LIN) and Straightness

(STR) Index and in the Beat Cross Frequency (BCF) variables and DNA fragmentation index trended to be lower in most of the colloidal centrifugation protocols. The studied protocols were shown to be as efficient in improving equine sperm quality as the commercial protocol recommended by the manufacturer, with the added advantage of being much more economical and simple to use. According to these results it seems to be possible to incorporate single layer and or high colloidal centrifugation volume protocols what would make them simple, economic and clinically viable for the equine sperm processing procedure.

Once colloidal centrifugation protocols were adapted to the equine reproductive clinics, we compared the efficacy of simple and colloidal centrifugation of fresh stallion sperm over sperm characteristics of non-centrifuged samples and pellets obtained after simple centrifugation of seventeen ejaculates from six P.R.E horses. Immediately after centrifugation straight-line velocity (VSL) was higher after colloidal than simple centrifugation ($p=0.000$), but there were no significant differences in the progressive motility or sperm DNA fragmentation as determined by the Sperm Chromatin Dispersion Test (SCD) between simple and colloidal centrifugation. However, when centrifuged spermatozoa were incubated at 37°C for 24 h (DNA Fragmentation Dynamics) to determine the rate of DNA fragmentation (r-SDF), a lower r-SDF ($p=0.0011$) was observed in those sperm recovered after colloidal separation compared to simple or no centrifugation. These results confirm that colloidal centrifugation of stallion spermatozoa results in prolonged sperm DNA longevity, but these differences were only apparent following a period of incubation and dynamic assessment.

Consequently, we strongly recommend the use of the dynamic form of the SDF assay for evaluating centrifugation and/or other ex vivo procedures, as it allows the expression of the DNA latent damage that is not visible immediately after ejaculation or manipulation.

Afterwards, we started to evaluate the use of this technique in the sperm conservation programs, by evaluating the effect of two single layer colloidal centrifugation protocols prior to equine sperm cryopreservation in combination with three commercial freezing extenders on the post-thaw sperm DNA fragmentation dynamics. Post-thaw DNA fragmentation levels in semen samples subjected to either of the colloidal centrifugation protocols were significantly lower ($p < 0.05$) immediately after thawing and after 4 h of incubation at 37°C compared to samples that underwent standard (control) centrifugation. The use of InraFreeze™ commercial freezing extender was associated with significantly less DNA fragmentation levels than the use of Botu-Crio™ commercial freezing extender at 6 h of incubation and than the use of either Botu-Crio™ or Gent™ commercial freezing extenders at 24 h of incubation. These results suggest that single layer colloidal centrifugation, both with raw and extended sperm, prior to cryopreservation reduces DNA fragmentation index during the first four hours after thawing. Further studies are needed to determine the influence of freezing extenders on equine sperm DNA fragmentation dynamics.

After the results obtained, we evaluated the incorporation of single layer colloidal centrifugation prior cryopreservation in clinical conditions within the Freeze-Test, observing the influence of centrifugation and freezing extender protocol in post-thawed sperm quality. Seventeen ejaculates were included in the experiment. Ejaculates which progressive motility in fresh semen were higher than 60% were classified as “Suitable for Cryopreservation” and were subjected to the standard Freeze-Test protocol (simple centrifugation). Ejaculates which progressive motility in fresh semen were lower than 60% were classified as “Non Suitable for Cryopreservation” and were processed through two different colloidal centrifugation protocols. If after colloidal centrifugation progressive motility increased $\geq 60\%$ samples were classified as “Acceptable After Colloidal Centrifugation”, if they did not raise up to 60 this value they were not processed. All cryopreserved samples were processed with three protocols with three different freezing extenders commonly used in the equine reproductive industry (modified Lactose-EDTA, InraFreeze® and Botu-Crio®).

Using colloidal centrifugation prior to cryopreservation the percentage of ejaculates available to be frozen was increased from 35% (6/17) to 71% (12/17), doubling the number of samples that could have been subjected to cryopreservation. We only found significant differences in post-thawed sperm parameters in LIN and Amplitude of Lateral head Movement (ALH) after 5 minutes of incubation at 37°C between colloidal and simple centrifugation processing techniques. No significant differences were found between both colloidal centrifugation protocols. Colloidal centrifugation allowed obtaining, from worse

fresh quality ejaculates, thawed sperm doses with similar quality to that of good quality ejaculates. BotuCrio® commercial freezing extender better optimized motility parameters and its characteristics. Colloidal centrifugation optimizes the efficiency of the technique as it allows increasing the number of ejaculates and stallions suitable for cryopreservation. Including new semen processing techniques with colloids to sperm conservation process, specifically in the freeze-test, could help to optimize the equine sperm cryopreservation protocols, especially when dealing with individuals or breeds which initially low sperm quality prevents or limits their inclusion in sperm cryopreservation programs.

The present investigation “Optimization of the equine sperm processing techniques to seminal conservation processes” led to the following conclusions:

- 1. It is possible to incorporate single layer and or high colloidal centrifugation volume protocols without negatively affecting sperm selection, what would make them simple, economic and clinically workable for the equine sperm processing procedure.
- 2. DNA fragmentation dynamics occurs slower and was less intense after fresh sperm colloidal centrifugation compared to non-processed fresh sperm and fresh sperm processed with simple centrifugation.

- 3. Colloidal centrifugation prior to cryopreservation allows obtaining thawed sperm samples with higher DNA integrity and maintaining a lower fragmentation index in time.

- 4. The dynamic assessment form of sperm DNA fragmentation can account for the latent expression of chromatin damage that is not always detected immediately after ejaculation or semen processing.

- 5. The commercial freezing extender InraFreeze™ presents a slower DNA fragmentation dynamics than BotuCrio™ and Gent™ freezing extenders. BotuCrio™ freezing extender maintains better sperm motility characteristics than InraFreeze™ and Lactose-EDTA extenders.

- 6. The Purebred Spanish Horse can be considered a low sperm quality bred, in relation to the high percentage of animal which progressive motility is lower than 50%.

- 7. When including colloidal centrifugation in a Clinical Freeze-Test, the protocol that incorporates 10ml of extended sperm over 10ml of the colloid was more effective than the protocol that includes 5ml of raw sperm over 5ml of colloid.

- 8. Colloidal centrifugation allows obtaining, from worse fresh quality ejaculates, thawed sperm doses with similar sperm quality to that of good quality ejaculates.

- 9. The clinical incorporation of colloidal centrifugation in the Freeze-Test increases the efficiency of the freezing technique, as the number of ejaculates and/or stallions suitable for cryopreservation are raised.

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

La recolección y conservación de gametos y embriones mediante el uso de las modernas tecnologías reproductivas permite un uso más racional del material genético de una especie, facilitando la multiplicación del número de ejemplares de alto valor genético y disminuyendo los niveles de consanguinidad.

El gran desarrollo de la inseminación artificial ha incrementado el interés de investigadores y clínicos por las técnicas de procesamiento de semen, poniendo de manifiesto la necesidad de desarrollar técnicas que minimicen el daño espermático a la vez que maximicen su viabilidad, supervivencia y fertilidad (Loomis, 2006).

1. Criopreservación de Semen Equino, Variabilidad Individual y Prueba de Congelación

El primer artículo sobre congelación de semen equino fue publicado por Smith y Polge en 1950 quienes lograron una supervivencia del 25% de los espermatozoides que congelaron a -79°C en una solución con glucosa y glicerol y unos años más tarde se describió el nacimiento del primer potro con semen congelado (Barker y Gandier, 1957).

Desde entonces se ha investigado mucho en esta tecnología y hoy en día el uso de semen criopreservado equino es cada vez más frecuente por las ventajas que supone, aunque existe aún gran variabilidad en cuanto a su calidad en el mercado y los resultados obtenidos con él, debido a una falta completa de estandarización en la metodología de procesado e inseminación así como en los criterios y métodos estándar de evaluación de la calidad seminal pre y postdescongelación (Samper y Morris, 1998; Metcalf, 2007; Sieme y col., 2008).

Sin duda uno de los factores más implicados en frenar el desarrollo a gran escala de esta tecnología y su estandarización es la variabilidad individual existente entre los sementales (Samper y Morris, 1998; Loomis, 2001; Sieme y col., 2008, Loomis y Graham, 2008; Mari y col., 2011), que se debe en gran medida al tipo de selección al que han sido sometidos, basada principalmente en términos de genealogía, rendimiento atlético o morfología, más que de eficiencia reproductiva (Varner y col., 2008; Mari y col., 2011). Por ello la clínica reproductiva equina es más cercana a la humana que la clínica reproductiva de otras especies animales.

En 1987, Amann y Pickett postularon que era poco realista asumir que todos los eyaculados de todos los sementales debían ser congelados con el mismo protocolo, pareciendo más sencillo optimizar los diluyentes y tasas de congelación y descongelación para cada individuo. Hoy en día muchos laboratorios comerciales de congelación de semen equino han adaptado un mecanismo denominado “Prueba de Congelación” para evaluar cada nuevo semental a la hora de incluirlo en un proceso de criopreservación seminal (Loomis y Graham, 2008). A través de este procedimiento, uno o varios eyaculados son divididos y procesados utilizando varios protocolos (incluyendo por lo menos varios diluyentes de congelación) con el objetivo de determinar con cuál de ellos el semental puede producir muestras postdescongelación de calidad aceptable, maximizando así los resultados obtenidos individualmente. Incrementar el número de sementales que pueden ser utilizados con éxito en la criopreservación de su semen se ha convertido en uno de los objetivos de la industria reproductiva equina (Loomis y Graham, 2008).

Internacionalmente se considera un semental “apto para congelación” si presenta unos valores de motilidad progresiva $\geq 50-60\%$ en semen fresco y $\geq 30-35\%$ en postdescongelación (Vidament y col., 1997; Samper y Morris, 1998; Loomis y Graham, 2008).

A menudo la “Prueba de Congelación” necesita ser ejecutada en varios eyaculados antes de elegir aquel que optimiza los resultados obtenidos, lo que supone un desembolso grande de tiempo y dinero para el propietario y un alto coste para el laboratorio de congelación. Sin embargo, es evidente el efecto

beneficioso que este procedimiento tiene sobre el número de sementales aceptados como aptos para la criopreservación seminal y son varios autores los que han relatado su eficacia en este sentido (Loomis, 1999; Vidament, 2005; Loomis y Graham, 2008).

También se han establecido diferencias en cuanto a la calidad seminal entre razas (Alvarenga y col., 2003), siendo el caballo de Pura Raza Española (PRE) un modelo de raza de mala calidad seminal (Benito y col., 2003). Debido a ello, contamos con un número limitado de ejemplares PRE que superen el 50% de motilidad progresiva necesario para que el procesado de congelación-descongelación dé resultados satisfactorios (Loomis y Graham, 2008).

Estudios en otras razas de caballos demuestran que sólo el 20-30% de los sementales producen un semen con buena capacidad de congelación, “*buenos congeladores*”, otro 40-60% aproximadamente con capacidad aceptable (aunque se ve afectado negativamente por la criopreservación) y otro 20-30% de sementales producen semen que no es congelable en absoluto, “*malos congeladores*”, aunque se trate de animales con buenos índices de fertilidad en monta natural (Tischner, 1979; Brinsko, 2000; Loomis y Graham, 2008). En el caso del caballo PRE partimos de una población sesgada ya que, debido a su mala calidad seminal en fresco, casi a la mitad de los ejemplares ni siquiera se les puede procesar su semen; por lo que nos encontramos que sólo un 15 % de los sementales PRE ofrece a la venta dosis seminales de calidad aceptable.



Foto 1. Foto detalle de extracción de semen en fantasma

2. Mecanismos de Criolesión en el Semen Equino

La calidad del semen congelado-descongelado depende de la capacidad de los espermatozoides de aguantar estos procedimientos sin perder sus funciones principales (Sieme y col., 2008). La pérdida de una sola de estas funciones podría reducir o suprimir totalmente la fertilidad del espermatozoide (Amann y Pickett, 1987). Durante los procesos de criopreservación se producen daños letales y subletales en los espermatozoides similares a la apoptosis (Watson, 2000; Ortega-Ferrusola y col., 2008; Sieme y col., 2008) que afectan a la viabilidad e integridad de los espermatozoides y por tanto a su vida media y capacidad fecundante (Graham, 1996; Heitland y col., 1996; Ortega-Ferrusola y col., 2008).

Los daños sufridos durante la criopreservación seminal han sido clasificados por varios autores según su origen en daños debidos a los cambios de temperatura (estrés térmico), de osmoloridad (estrés osmótico) o a la acción de agentes oxidantes (estrés oxidativo), si bien todos ellos están interconexionados.

2.1 Estrés Osmótico

Hasta hace unos años la hipótesis aceptada entre especialistas en reproducción postulaba que la muerte de las células espermáticas durante la congelación era resultado de la formación de cristales intracelulares si el enfriamiento era muy rápido o a la exposición prolongada a una ambiente hiperosmótico que las deshidrataba si el enfriamiento era muy lento. Sin embargo, técnicas avanzadas de evaluación han demostrado que no se produce formación de cristales intracelulares en los espermatozoides equinos ni humanos con las tasas

de congelación actualmente utilizadas, por lo que la principal fuente de daño durante la criopreservación parece venir del estrés físico-osmótico resultado de la formación de cristales extracelulares (Morris, 2006; Morris y col., 2007; Peña y col., 2011) que exponen a los espermatozoides a un medio hiperosmótico de forma creciente (Sieme y col., 2008) que provoca una pérdida de agua intracelular que hacen que las células disminuyan su volumen hasta que se igualan las concentraciones del medio extra e intracelular (Mazur, 1984). En la descongelación ocurre el fenómeno inverso puesto que el medio extracelular recupera su osmolaridad inicial haciendo que los espermatozoides estén expuestos a un ambiente hipoosmótico que determina una entrada de agua al interior de las células incrementando su volumen (Sieme y col., 2008).

Este doble estrés osmótico puede provocar un daño potencial en la membrana plasmática (Pommer y col., 2002), en el citoesqueleto (Correa y col., 2007; Gutiérrez-Pérez y col., 2011) o en las mitocondrias (Pommer y col., 2002) si se supera el rango de tolerancia a estos cambios de volumen, “Tolerancia Osmótica Espermática”, que en el espermatozoides equino se ha determinado entre los 450 y los 1500mOsm/Kg (Peña y col., 2011).

2.2 Estrés Térmico

Debido a los cambios bruscos de temperatura producidos durante el proceso de criopreservación se producen alteraciones en las propiedades termodinámicas y estructurales de los espermatozoides que afectan a su viabilidad (Chakrabarty y col., 2007), afectándose principalmente la membrana plasmática y acrosomal. Los

lípidos de membrana sufren una transición de estado líquido a fase gel alterándose su organización (Hammerstedt y col., 1990; Holt y North, 1991) y por tanto su integridad y funcionalidad (Parks y Graham, 1992; Macías García y col., 2011a, 2011b). Además, se producen alteraciones en la distribución y funcionalidad de las proteínas de membrana (Bailey y Buhr, 1994) y en el citoesqueleto (Watson, 2000).

La composición lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides, está correlacionada con la tolerancia al estrés por frío (Macías García y col., 2011a) y al grado de peroxidación lipídica (Aitken, 1995). Se ha evidenciado que la membrana plasmática de los espermatozoides equinos descongelados es menos fluida y más rígida que la de los espermatozoides frescos (Peña y col., 2004).

2.3 Estrés Oxidativo

Durante el metabolismo oxidativo fisiológico de las células espermáticas se producen especies reactivas de oxígeno o “radicales libres” (EROs) que desempeñan un papel importante en la funcionalidad espermática de capacitación, reacción acrosómica y en el mantenimiento de la capacidad fecundante entre otros (Agarwal y col., 2008; Desai y col., 2009). El problema se desencadena cuando se produce un desequilibrio en la producción o degradación de estas sustancias, lo que da lugar a la producción de efectos adversos sobre los espermatozoides que afectan a la membrana plasmática, el ADN o parámetros espermáticos como la motilidad (Baumber y col., 2000, 2002, 2003; Aziz y col., 2004).

Los espermatozoides equinos dañados o anormales que forman parte de la población heterogénea tras la descongelación generan mayor cantidad de EROs que los vivos o normales (Ball y col., 2001) afectando negativamente a estos (Baumber y col., 2002, 2003; Peña y col., 2011).

2.4 Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada desencadenado a través de la vía extrínseca, iniciada por receptores de la familia del Factor de Necrosis Tumoral, o la vía intrínseca, activada en células que presentan alteraciones en su homeostasis resultado de un estrés térmico, hipoxia, EROs... (Youle y Strasser, 2008) y no sólo es un fenómeno patológico sino un mecanismo fisiológico para eliminar los espermatozoides del tracto reproductivo de la hembra.

Los procesos de congelación y descongelación inducen fenómenos similares a la apoptosis tanto a través de la vía intrínseca de la apoptosis como extrínseca (Peña y col., 2011).

3. Evaluación Seminal

Los verdaderos indicadores de la fertilidad del semental son las tasas de gestación y natalidad, pero ambos son retrospectivos y están influenciados por factores independientes de la fertilidad del caballo como son la fertilidad de la hembra y el manejo reproductivo (Colebrander y col., 2003; Samper y Estrada, 2007). Por tanto, es importante tener en cuenta que la fiabilidad de la evaluación seminal como indicador de la fertilidad de un semental no es absoluta. Una baja calidad suele ser un buen indicador de subfertilidad, sin embargo, una buena calidad de semen no es garantía aceptable de fertilidad (Colenbrander y col., 2003). Ningún parámetro del análisis seminal rutinario explica más del 30% de la fertilidad de dicho semen (Quintero-Montero y col., 2003) ya que en cada análisis sólo un pequeño número de espermatozoides, y sólo parte de las estructuras que lo componen, son evaluadas. Por todo ello, son numerosos los autores que resaltan la importancia de evaluar y combinar múltiples parámetros espermáticos a la hora de evaluar una muestra seminal (Wilhelm y col., 1996a; Colenbrander y col., 2003; Kirk y col., 2005; Samper y Estrada, 2007).

3.1 Evaluación del Volumen Espermático

El volumen obtenido se evalúa tras la recolección utilizando el mismo recipiente utilizado en la recogida (que consta de un filtro que permita eliminar la fracción gel y la mayor parte de la suciedad) o bien tras filtrarlo y transferirlo a un recipiente escalado y atemperado (Pickett y Amann, 1993; Squires y col., 1999).

El volumen medio obtenido ronda entre los 60-100ml (Hafez y Hafez, 2002), aunque pueden obtenerse volúmenes tan dispares entre los sementales de entre 10ml a más de 250ml. Son varios los factores que pueden afectar el volumen de semen obtenido en un semental como el individuo, la raza, la edad, la frecuencia de recogida, el nivel de estimulación o la época del año (Pickett y col., 1970; Thompson y col., 1977; Blanchard y col., 1998; Miró y Ocaña, 2006; Samper y Estrada, 2007; Squires, 2011). El volumen de gel obtenido también es variable, de no presentarse a estar en un volumen bastante elevado.

3.2 Evaluación del Color y Aspecto del Eyaculado

La inspección visual del semen tras su recolección y filtrado es un paso importante para evaluar el color y apreciar la posible existencia de anomalías/contaminaciones.

El color normal del semen varía de blanquecino a blanco grisáceo-crema según la concentración espermática pudiendo aparecer colores u olores anormales que suelen ser indicativos de problemas (Samper y Estrada, 2007; Brinsko y col., 2011).

3.3 Evaluación de la Concentración Espermática

Los valores de concentración espermática media fluctúan entre los 150-300 millones/ml con un rango de variación muy amplio (50-800 millones/ml) (Hafez y Hafez, 2002). Está afectada por la producción espermática y por la cantidad de plasma seminal en el eyaculado.

3.3.1 Métodos de Evaluación de la Concentración Espermática:

3.3.1.1 Cámara de Contaje o Hemocitómetro

Es un método directo de contaje de células y aunque consume mucho tiempo, se considera uno de los métodos más exactos. Existen diversos modelos de cámara y cada una presenta sus propias instrucciones detalladas, aunque en términos generales una fórmula matemática que tiene en cuenta la dilución realizada y la profundidad, superficie y número de cuadros de la cuadrícula observados nos da la concentración de la muestra (Samper y Estrada, 2007). Para semen equino se ha descrito el uso de la cámara de Neubauer (Vanderwall, 2008) y el de la cámara Bürker (Kuisma y col., 2006).

3.3.1.2 Densímetro o Espectrofotómetro Calibrado para Semen Equino

El funcionamiento básico de este tipo de sistemas consiste en hacer pasar un haz de luz a través de la muestra midiendo la cantidad de luz que es capaz de atravesar (transmitancia) o que queda retenida (absorvancia), convirtiendo este valor de densidad óptica en un valor de concentración espermática, contrastándolo con una recta patrón realizada previamente con diluciones de semen de concentración conocida (Squires y col., 1999; Samper y Estrada, 2007). La ventaja principal es que permite ahorrar tiempo y aunque es una valoración indirecta es bastante objetiva y exacta (Blanchard y col., 1998) si la concentración no es demasiado alta o baja ($100-300 \times 10^6$ espermatozoides/ml) y si no existen detritus, sangre, material purulento o células germinales. El coeficiente de variación es menor que en las cámaras (Brinsko y col., 2011).

3.3.1.3 Contadores Celulares Electrónicos

El uso de contadores celulares electrónicos como el Núcleo Counter SP-100® permite obtener resultados más exactos y repetibles que los obtenidos con la fotometría sin existir además interferencias por la presencia de detritus o material contaminante (Hansen y col., 2006; Brinsko y col., 2011). Se basa en la utilización de un fluorocromo de ADN (Yoduro de Propidio) que penetrará en las células espermáticas previamente lisadas por el reactivo (S100 en el caso del Núcleo Counter SP-100®) para su posterior contaje por fluorocromometría.

3.3.1.4 Análisis Espermático Asistido por Ordenador (CASA: Computer Assisted Sperm Analysis)

En este caso la determinación de la concentración se realiza a través de un software informático conectado a un microscopio. Se recomienda el uso de cámaras con volúmenes fijados que permiten el contaje de una muestra monocapa de espermatozoides, lo que permite determinar la concentración por unidad de volumen, y aunque la distribución de partículas por la cámara no es uniforme, este efecto se corrige a través de fórmulas matemáticas (Douglas-Hamilton y col., 2005).

3.4 Evaluación de la Motilidad Espermática

Es el parámetro más utilizado para valorar la calidad del semen debido a su simplicidad y bajo coste. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (MP) por eyaculado se ha asociado a la fertilidad y se considera un parámetro fundamental para la determinación de la capacidad fertilizante de los

espermatozoides (Varner, 2008) a pesar de que no se ha correlacionado directamente con la fertilidad real (Jasko y col., 1992; Malgrem, 1997; Katila, 2001; Varner, 2008).

En caballos hay que tener en cuenta que en un 50% de los casos y de forma fisiológica la inserción del flagelo en la cabeza es abaxial (Dott, 1975), lo que determina que el patrón de movilidad progresiva no sea tan rectilíneo como en otras especies (Kenney y col., 1983).

3.4.1 Métodos de Evaluación de la Motilidad Espermiática:

3.4.1.1 Evaluación Subjetiva Bajo Microscopio (Evaluación Visual)

Es la evaluación rutinaria aunque no es muy precisa ni exacta y está altamente influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, luz, desinfectantes, osmolaridad/pH del diluyente, suciedad...) y la experiencia del técnico encargado (Davis y Katz, 1993; Katila, 2001). Ello hace que sea muy importante que la técnica sea correcta y que se optimicen y estandaricen las condiciones ambientales (Katila, 2001; Varner, 2008). Cambios en temperatura pueden dar lugar a descensos en la motilidad y una evaluación errónea de la misma, por lo que las muestras y todo el material en contacto con el semen debe permanecer a esta temperatura de 37-39°C mediante la utilización de baños maría y pletinas calentables.

El semen debe diluirse (25-50 millones/ml) previamente a su observación con un diluyente atemperado que no altere la motilidad, para evitar la aglutinación o la adhesión del semen al cubreobjetos (Katila, 2001; Samper y Estrada, 2007; Varner, 2008), se utiliza una gota de entre 5-10 μ l (Samper y Estrada, 2007) sobre un porta cubierto con un cubreobjetos (ambos precalentados) y se observan varios campos de la muestra, evitándose los bordes de la misma que están más expuestos al aire (Katila, 2001). Se estima la motilidad total y progresiva y adicionalmente se puede realizar una estimación de la velocidad o vigor espermático con una escala arbitraria de 0-4, donde 0 es estacionaria y 4 rápida (Varner, 2008).

3.4.1.2 Evaluación Objetiva mediante Evaluación de la Movilidad Espermática

Se basa en la determinación de la movilidad global de una muestra de semen y no la motilidad espermática (movimiento individual) a través del cambio en la absorbancia medida por fotometría que experimenta una solución (Accudenz®), tras incubación durante cinco minutos, con la muestra de semen sobre la misma, de modo que los espermatozoides móviles la atravesarán incrementando su absorbancia (Froman, 2007). Esta técnica ha sido validada para varias especies, entre ellas los caballos (Vizcarra y Ford, 2006).

3.4.1.3 Evaluación Objetiva mediante Analizador de Calidad Espermática

Se basa en la determinación de la motilidad total y progresiva de una muestra de semen a partir de las alteraciones que sufre un haz de luz al pasar a través de un capilar cargado con la muestra, convirtiendo dichas señales en porcentajes numéricos (Bartoov y col., 1981).

3.4.1.4 Evaluación Objetiva mediante Análisis Espermático Asistido por Ordenador o Sistema Computerizado CASA (Computer Assisten Sperm Analysis)

El Sistema Computerizado de Análisis de Semen (CASA) fue desarrollado en la Universidad de Pennsylvania por Liu y Warne en 1977 y perfeccionado por Amann y Hammerstedt en 1980. Da mayor objetividad y seguridad en la evaluación, permitiendo la reducción de la variabilidad entre observadores (Varner, 2008) y una evaluación más exacta de las características del movimiento individual de los espermatozoides (Jasko, 1992; Verstegen y col., 2002). El problema es su mayor coste y la complicación de su uso (Varner, 2008).

Los sistemas computerizados se basan en la captura y digitalización sucesiva de imágenes a través de un microscopio de contrastes de fases de la trayectoria de cada espermatozoide para, posteriormente, interpretarse a través de un software y reflejarse en una serie de parámetros calculados matemáticamente y que representan las características de su movimiento (Verstegen y col., 2002). Es preciso determinar los ajustes técnicos del software, “set up”, a utilizar para la evaluación de semen, ya que se ha visto su influencia sobre los resultados obtenidos en varias especies, entre ellas los équidos (Rijsselaere y col., 2003; Loomis y Graham 2008; Contri y col., 2010; Lenz y col., 2011)

Los parámetros de motilidad determinados por la mayoría de los sistemas CASA son los siguientes:

- *Velocidad Promedio (VAP)*: velocidad de la trayectoria promedio del espermatozoide (mm/s).
- *Velocidad curvilínea (VCL)*: distancia recorrida por el espermatozoides a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo (mm/s).
- *Velocidad rectilínea (VSL)*: velocidad del recorrido rectilíneo del punto inicial al final (mm/s).
- *Índice de linearidad (LIN)*: es el cociente entre la VSL y VCL (%).
- *Índice de rectitud (STR)*: es el cociente entre la VSL y VAP (%).
- *Índice de oscilación (WOB)*: es el cociente entre la VAP y VCL (%).
- *Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)*: desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides móviles (mm/s).
- *Frecuencia de batida (BCF)*: frecuencia de batida del flagelo de los espermatozoides móviles (Hz).

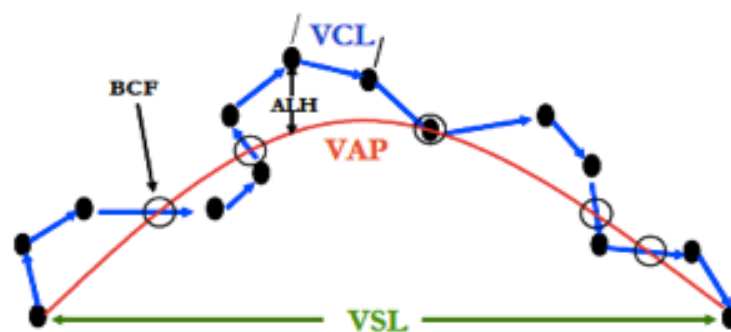


Figura 1. Representación esquemática de alguno de los parámetros evaluados por los Sistema CASA (Álvarez, 2005).

3.5 Evaluación de la Morfología Espermática

Aunque la correlación entre la morfología y la fertilidad no ha sido totalmente establecida (Blanchard y col., 1998), se ha descrito que los sementales fértiles tienen más del 60% de espermatozoides morfológicamente normales y menos del 5% de morfoanomalías del acrosoma y pieza intermedia (Samper y Estrada, 2007) y que la fertilidad se compromete cuando los niveles de morfología normal caen por debajo del 40% (Katila, 2001).

Tradicionalmente las anomalías morfológicas espermáticas se clasificaban en *primarias*, *secundarias* y *terciarias* según su origen, de modo que las primeras se consideraban malformaciones de origen testicular (resultado de un defecto en la espermatogénesis), las secundarias de origen epididimario (defecto en la maduración) y las terciarias de origen *in vitro* (defectos en el manejo) (Blanchard y col., 1998; Varner, 2008). La tendencia actual es clasificar las morfoanomalías según su tipo (Figura 2), puesto que el origen de muchos de los defectos es aún desconocido y otros pueden tener un origen múltiple (Blanchard y col., 1998; Varner, 2008). Se sabe que determinados defectos morfológicos (gotas citoplasmáticas, colas dobladas...) tienen menor efecto sobre la fertilidad que otros (cabezas sueltas, formas anormales de la cabeza o pieza intermedia, colas enrolladas, células germinales prematuras...) (Love y col., 2000). Varner (2008) recomienda el conteo y clasificación según su tipo de al menos 100 células espermáticas.

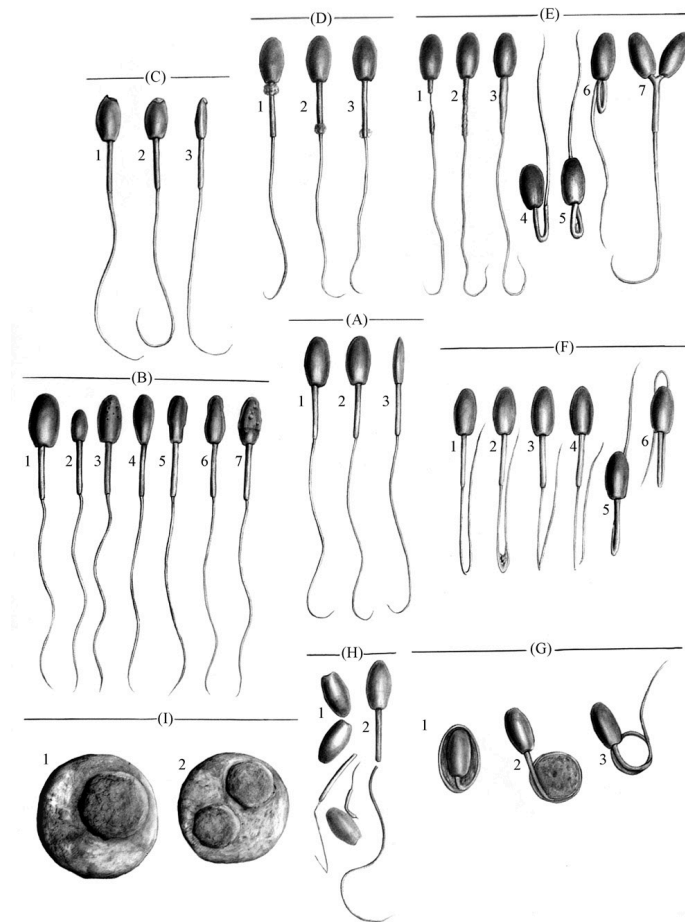


Figura 2 (Varner, 2008). Imágenes que reflejan las morfologías normales y anormales de los espermatozoides equinos vistos sobre preparaciones fijadas no teñidas en microscopio de contraste de fases:

- (A) Morfología espermática normal, en vistas dorsoventral (A1,A2) y lateral (A3). Piezas intermedias abaxiales (A1) se consideran morfológicamente normales.
- (B) Variaciones de la morfología anormal de la cabeza: Macrocefalia (cabeza grande) (B1), Microcefalia (cabeza pequeña) (B2), Vacuolas nucleares (o defecto cráter, considerado normal en nuestro laboratorio si se encontraban en pequeño número y de pequeño tamaño de forma aleatoria sobre la región acrosómica) (B3) Cabeza cónica (B4) Cabeza piriforme (B5) Cabeza constricta (B6) Cabeza degenerada (B7)
- (C) Defectos acrosómico en vista dorsoventral (C1, C2) y lateral (C3). Este defecto morfológica se denomina "acrosoma nudoso"
- (D) Gotas Citoplasmáticas Proximal (D1) y Distal (D2, D3).
- (E) Anormalidades de la pieza intermedia, incluyendo aplasia segmental de la vaina mitocondrial (E1), pieza intermedia deteriorada por una distribución desigual de las mitocondrias (E2), vaina mitocondrial alargada (E3), piezas intermedias dobladas (E4,E5,E6), piezas intermedias/cabezas dobles (E7).
- (F) Cola doblada Envolviendo a la región media de la piezas principal (F1–F4) o con un doblamiento singular (F5) o proximal (F6) envolviendo a la pieza intermedia y principal.
- (G) Colas enrolladas, con la cola formando un círculo cerrado alrededor de la cabeza (G1) o con la cola enrollada no alrededor de la cabeza (G2, G3).
- (H) Espermatozoides fragmentados, incluyendo cabezas sueltas (H1) o fragmentadas a nivel del annulus (H2). La fragmentación puede ocurrir a otros niveles, como se observa en F4
- (I) Células germinales prematuras mono (I1) o multinucleadas (I2).

Se asume que los espermatozoides morfológicamente anormales no afectan negativamente a los normales por lo que el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales parece aportar una mayor información sobre la fertilidad del semental que el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales (Varner, 2008).

Existen una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y la motilidad espermática, de modo que los porcentajes de morfología normal y motilidad progresiva espermática de una muestra suelen ser similares (Varner, 2008).

3.5.1 Métodos de Evaluación de la Morfología Espermática:

3.5.1.1 Preparaciones Teñidas Fijadas en Portaobjetos

Se pueden usar diferentes tinciones según el laboratorio como las tinciones espermáticas específicas de Williams (Williams, 1950) o Cassarett (Cassarett, 1953), tinciones celulares generales (Hematoxilina-Eosina, Giemsa, Wright's), así como las tinciones de fondo (Eosina-Nigrosina...) (Barth y Oko, 1989; Varner, 2008). Las muestras teñidas serán observadas bajo microscopio óptico (magnificación 1000x). De entre ellas la más usada por su facilidad de aplicación en semen animal es la tinción de Eosina-Nigrosina que también es utilizada para la valoración de la viabilidad espermática. Para su utilización se debe incubar la muestra de semen a 37°C durante cinco minutos y colocar 10 μ l de la misma y 10 μ l de la tinción sobre el extremo de un portaobjetos, homogenizando ambas gotas y realizando una extensión con el canto de otro porta (Samper y Estrada, 2007).

3.5.1.2 Preparaciones Húmedas sin Teñir

Son preferibles pues se disminuyen los artefactos encontrados y se mejora la visualización (Kenney, 1983; Samper y Estrada, 2007; Varner, 2008). La muestra de semen debe ser fijada en una solución tamponada de glutaraldehído o citrato formol para permitir su evaluación y que ésta no sea afectada por el tiempo (Brinsko y col., 2011). Se observan las células en un microscopio bajo aceite de inmersión (1000x) o preferiblemente de contraste de fases (Kenney, 1983).

3.6 Evaluación de la Vitalidad Espermática

La vitalidad de los espermatozoides se valora indirectamente mediante la valoración de la integridad de la membrana plasmática, cuyo papel es vital en la regulación de las funciones espermáticas (Varner, 2008).

3.6.1 Métodos de Evaluación de la Integridad de las Membranas Espermáticas:

3.6.1.1 Uso de Tinciones No Fluorescentes (Tinciones Supravitales)

El uso de técnicas de tinción no fluorescentes para la evaluación de la viabilidad espermática se basan en la capacidad que tiene la membrana íntegra de absorber el tinte y eliminarlo (vivos), mientras que en los espermatozoides en los que la membrana no es funcional el tinte difundirá al interior coloreando la célula (muertos). Por ello se denominan “Técnicas de *Evaluación de Vivos y Muertos*” (Barth y Oko, 1989) y permiten valorar al mismo tiempo la morfología y la vitalidad (Barth y Oko, 1989). Las tinciones no fluorescentes son sencillas y para su observación requieren sólo de un microscopio óptico con un objetivo de inmersión

(1000x) (Samper y Estrada, 2007). Dentro de las tinciones no fluorescentes se incluye la tinción de Eosina-Nigrosina, con la que los espermatozoides muertos o con el acrosoma dañado se visualizarán rosas por la eosina mientras que los vivos permanecerán blancos sobre el fondo oscuro de nigrosina (Brinsko y col., 2011) o el Tripán-azul (Varner, 2008).

3.6.1.2 Uso de Tinciones Fluorescentes

Se basan en el uso de tintes fluorescentes extracelulares que pueden ser no permeables, de modo que no difundirán hacia el interior de la membrana plasmática cuando ésta está intacta, o permeables, que son soluciones fluorescentes que difunden a través de la membrana plasmática y se hidrolizan en el citosol en compuestos fluorescentes que quedan retenidos en el interior de la célula si la membrana está intacta (Varner, 2008). Dentro de los tintes fluorescentes no permeables destacan test comerciales como el Propidio de Yodo, YO-PRO®-1, TOTO®-1 y entre los tintes fluorescentes permeables el Calcein AM o Dihidrocalcein AM, SYBR®-14 o el Diacetato de Carboxifluoresceína (Varner, 2008).

Además se usan combinaciones de los anteriores para incrementar la información obtenida como es la combinación SYBR®-14/Yoduro de Propidio (Garner y Johnson, 1995; Garner y col., 1997). Love y colaboradores (2003) establecieron una correlación entre el porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra.

También es posible la combinación de tintes fluorescentes de membrana con tintes mitocondriales (Garner y col., 1999; Love y col., 2003) o acrosómicos (Cross y col., 1986; Graham y col., 1990; Kirk y col., 2001; Kavak y col., 2003) que permite evaluar conjuntamente la integridad del acrosoma y la viabilidad espermática diferenciando los cambios que se producen en el acrosoma cuando los espermatozoides están vivos o en proceso de capacitación (Neild y col., 2000). Entre estas combinaciones destacan la técnica de triple tinción fluorescente en équidos (Graham y col., 1990; Graham 2001; Gravance y col., 2001) con las combinaciones de SYBR®14-Yoduro de Propidio-JC 1 (Love y col., 2003) o FITC-DNA- Yoduro de Propidio-Carbox-SNARF-1 (Cross y col., 1986; Graham y col., 1990; Kirk y col., 2001; Kavak y col., 2001, 2003).

3.6.1.3 Test Hiposmótico (HOST, Hypo-Osmotic Swelling Test)

Este método de evaluación fue descrito por primera vez por Drevius y Ericksson en 1966. Evalúa la integridad y funcionalidad de la membrana flagelar analizando su respuesta a la exposición a un medio hipotónico (de entre 50-100mOsm) analizando su función osmorreguladora (Jeyendran y col., 1992; Neild y col., 1999). De modo que si la membrana está íntegra y funciona adecuadamente el espermatozoide incorporará agua de forma activa en el citosol provocando cambios morfológicos en su flagelo asociados a esta endósmosis (enrollamiento o replegamiento) que no serán apreciados en los espermatozoides osmorregulatoriamente incompetentes (Varner, 2008).

Se ha correlacionado de forma alta con otros test predictivos de fertilidad (Colenbrander y col., 2003), y valores inferiores al 40% se han relacionado con sementales de fertilidad dudosa (Neild y col., 2000).

3.7 Evaluación de la Cromatina Espermática

En clínica reproductiva humana el daño en el ADN espermático ha demostrado presentar asociaciones fuertes con todos los puntos de control de fertilidad (fallo en la fertilización, desarrollo embrionario lento, menor implantación, malformaciones...) (Fatehi y col., 2006; Lewis, 2013), correlacionándose con la tasa de nacimientos vivos y la tasa de abortos (Lewis, 2013). Esta fuerte relación entre la fragmentación de la cromatina espermática y la fertilidad se ha establecido también en cerdos y toros (Agarwal y Allamaneni, 2004; Zini y Libmanal, 2006; Brahem y col., 2011; Bungum y col., 2011), lo que no ocurre con la mayoría de los parámetros seminales (Wilhelm y col., 1996a; Love y Kenney, 1998; Kirk y col., 2005; Madrid-Bury y col., 2005; López-Fernández y col., 2007; Morrell y col., 2009d).

Por todo ello se ha determinado que el conocimiento del daño que sufre el ADN en las muestras de semen fresco y durante su procesado para preservación podría aportar mayor información del potencial reproductivo del semental (Madrid-Bury y col., 2005; López-Fernández y col., 2007), y que su exclusión de los análisis seminales resultaría en un porcentaje importante de infertilidad del semental que permanecería sin detectar (López-Fernández y col., 2007):

Se sabe que cuando los espermatozoides equinos son manipulados para preservación se incrementa significativamente los valores de fragmentación del ADN espermático (López-Fernández y col., 2007; Cortés-Gutiérrez y col., 2008). Este daño parece ser consecuencia indirecta del estrés asociado a los cambios de temperatura, osmolaridad e inestabilidad de membrana que podría llevar a la activación de vías de apoptosis como las de estrés oxidativo que resultan en fragmentación del ADN (Zini y col., 2001; Baumber y col., 2003; López-Fernández y col., 2007).

Algunos autores recomiendan la evaluación de la dinámica de la fragmentación del ADN (Gosálvez y col., 2011a), que permite la expresión del daño latente de la cromatina espermática que no es visible inmediatamente tras la eyaculación, la criopreservación o el procesado (Gosálvez y col., 2011a, 2011b). Los valores de fragmentación del ADN espermático se incrementan tras la descongelación, sin embargo, este daño puede no ser evidente en los primeros minutos, como sí ocurre con otros parámetros como la motilidad y viabilidad espermática sino que se visualiza tras la incubación a 37°C (López-Fernández y col., 2007; Cortés-Gutiérrez y col., 2008).

Aunque aún no están establecidos los valores normales del Índice de Fragmentación del ADN (sDFI) para el equino, se recomienda tomar precauciones al usar sementales para IA cuyos eyaculados tengan un sDFI > 15-20% (López-Fernández y col., 2007).

3.7.1 Métodos de Evaluación de la Fragmentación de la Cromatina

Espermática:

Hay dos estrategias para estimar la fragmentación del ADN espermático (Cortés Gutiérrez y col., 2007).

La primera se basa en la incorporación enzimática de nucleótidos marcados e incluye a técnicas como la Técnica Terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) o la Técnica In Situ Nick Translation (ISNT).

La segunda se basa en medir la diferente sensibilidad de la cromatina espermática a desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. Incluye técnicas como la Evaluación de la Estructura de la Cromatina Espermática o Sperm Chromatin Structure Assay en inglés (SCSA), Técnica DNA Breakage Detection-Fluorescence *in situ* Hybridization (DBD-FISH), la Evaluación de la Dispersión de la Cromatina Espermática o Sperm Chromatin Dispersion (SCD) y Ensayo Cometa.

Metodologías que se basan en el marcaje de roturas del DNA				
Método	Instrumental	Ventajas	Desventajas	Utilidad clínica
TUNEL	Microscopio Fluorescencia Citometría de flujo	Cumple con parámetros de control de calidad	Equipo sofisticado y costoso	Fertilidad masculina Reproducción asistida Pérdidas fetales
ISNT	Microscopio Fluorescencia Citometría de flujo	Reacción de marcaje directo	Equipo sofisticado y costoso	Fertilidad masculina
Metodologías que se basan en la susceptibilidad del DNA para desnaturalizarse				
SCSA	Citometría de flujo	Punto de corte establecido (30%) para diferenciar pacientes fértiles e infértiles	Instrumentación costosa Capacitación técnica	Recomendada en estudios epidemiológicos de infertilidad
COMETA	Microscopio Fluorescencia Electroforésts DNA	Bajo costo	Lento de ejecución Requiere observador con experiencia	Fertilidad masculina Reproducción asistida Criopreservación de esperma
SCD	Microscopio Fluorescencia campo claro	Análisis simple de resultados Bajo costo	Aún no determinada	Aún no determinada Varicocele?
DBD-FISH	Microscopio Fluorescencia	Revela modificaciones estructurales de la cromatina.	Procedimiento sofisticado y costoso	Aún no determinada

Tabla 1. Resumen de las técnicas de evaluación de la fragmentación del ADN espermático (extraído de Cortés-Gutiérrez y col., 2007).

3.7.1.1. Terminal dUTP Nock-End Labeling (Ensayo TUNEL)

Técnica basada en la incorporación enzimática *in situ* de nucleótidos marcados en los extremos de las roturas existentes en el ADN, que serán posteriormente detectados porque bien están directamente marcados con el fluorocromo o bien porque se someten a una reacción posterior con un anticuerpo conjugado con el fluorocromo que se visualizan a través de microscopía de fluorescencia o citometría de flujo (Lopes y col., 1998, Cortés-Gutiérrez y col., 2007). Se mide el porcentaje de células con ADN marcado.

El problema es que requiere de un equipo y personal especializado por lo que a pesar de existir un kit comercial no se usa de rutina a nivel clínico (Cortés-Gutiérrez y col., 2007).

3.7.1.2 Técnica In Situ Nick Translation (ISNT)

Técnica de incorporación enzimática *in situ* de nucleótidos marcados similar a la técnica TUNEL cuya mayor diferencia radica en que la incorporación de nucleótidos es mayor, ya que utiliza la cadena de ADN complementario como molde y presenta actividad enzimática exonucleasa (Gorczyca y col., 1993; Manicardi y col., 1995).

Presenta unos inconvenientes similares a la anterior con el problema añadido de que no existe kit comercial disponible para su uso en espermatozoides (Cortés-Gutiérrez y col., 2007).

3.7.1.3 DNA Breakage Detection-Fluorescence *in situ* Hybridization (Técnica DBD-FISH)

Se basa en la mayor sensibilidad a la desnaturalización y extracción de proteínas que tienen los extremos de rotura de la cadena del ADN a través de soluciones de lisis alcalinas y posterior hibridación de dichas roturas con una sonda de ADN (Fernández y col., 2000), de modo que cuantas más roturas existan en la cadena mayor será el nivel de marcado del núcleo (Fernández y col., 2000). Al igual que las dos anteriores no se usa de rutina, pero desde el punto de vista de la investigación es muy útil ya que es la única técnica disponible que permite evaluar el daño de célula a célula *in situ* en secuencias específicas de ADN (Fernández y col., 2002).

3.7.1.4 Ensayo Cometa

Se fundamenta en el principio de que el ADN de un núcleo desproteínizado que contenga roturas en sus cadenas se moverá más fácilmente hacia el polo positivo al someterlo a electroforesis (Aravindan y col., 1997). Se basa en someter a los espermatozoides incluidos dentro de un gel de agarosa a una solución de lisis con un agente reductor y someterlos a electroforesis y posterior tinción con un fluorocromo para visualizar la diferencia colorimétrica generada por el desplazamiento, de modo que los espermatozoides con el ADN íntegro no generan apenas imágenes de cola de cometa mientras que los que tienen ADN fragmentado generan una imagen similar a un cometa (Singh y col., 1988). Por tanto, el porcentaje de células con colas de migración se corresponde a los espermatozoides con ADN fragmentado.

El mayor inconveniente es que requiere de material, personal y/o software especializados no usados de rutina en andrología, por lo que principalmente se utiliza en investigación (Cortés-Gutiérrez y col., 2007).

3.7.1.5 Evaluación de la Estructura de la Cromatina Espermática, Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

Esta prueba fue desarrollada por Evenson y colaboradores en 1980 y evalúa la susceptibilidad del ADN espermático a la desnaturalización *in situ* tras la exposición a condiciones ácidas o de calor junto a las diferentes características colorimétricas del fluorocromo Naranja de Acridina que emite color verde al excitarse si se incorpora como monómero entre las dos cadenas de ADN, cuando el ADN está intacto, o rojo anaranjado si se incorpora al ADN de cadena sencilla, cuando el ADN está fragmentado (Evenson y col., 1980). Las células teñidas se someten a citometría de flujo para discriminar ambos colores (Hoshi y col., 1996). El índice de fragmentación del ADN (sDFI) corresponderá al porcentaje de células con fluorescencia roja respecto al total de células (rojas y verdes).

Es la técnica de referencia para la evaluación de la fragmentación del ADN espermático (Cortés-Gutiérrez y col., 2007) y la más aceptada para establecer relaciones entre esta fragmentación y la fertilidad del individuo (Cortés-Gutiérrez y col., 2007).

El mayor inconveniente es que necesita de citometría de flujo para su evaluación (Cortés-Gutiérrez y col., 2007).

3.7.1.6 Evaluación de la Dispersión de la Cromatina Espermática, *Sperm Chromatin Dispersion (SCD)*

Técnica que valora mediante microscopía de campo claro o fluorescencia el tamaño del halo de dispersión que experimenta la cromatina espermática tras someter a los espermatozoides a un tratamiento de lisis ácido que rompe y extrae las proteínas que compactan el ADN espermático (Fernández y col., 2005; Cortés-Gutiérrez y col., 2007). Se basa en la diferente respuesta que experimenta la cromatina del núcleo de los espermatozoides con ADN fragmentado y no fragmentado al tratamiento de depleción proteica de modo que en los espermatozoides fragmentados tras el tratamiento se liberan los fragmentos de ADN haciendo que la cromatina se disperse alrededor del núcleo formando un halo periférico no muy intenso que contrasta con el núcleo, mientras que en los no fragmentados se desarrolla un halo de dispersión pequeño que forma una corona alrededor del núcleo (Figura 3). El sDFI será el porcentaje de células con halo de fragmentación respecto al total de células.

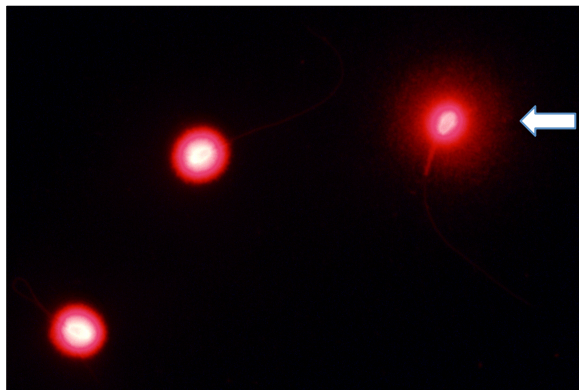


Figura 3. Fragmentación del ADN espermático equino tras test SCD visualizado con microscopía de fluorescencia. La flecha señala el espermatozoide que muestra un halo de dispersión de la cromatina correspondiente a ADN fragmentado.

Al igual que en el Ensayo Cometa se requiere que los espermatozoides se incluyan en un gel de agarosa pero al no necesitarse la electroforesis ni personal especializado se simplifica la técnica (Cortés-Gutiérrez y col., 2007).

Para la realización a través de los kits comerciales, como el del Kit para semen equino Halomax®, se deben añadir a los viales con agarosa un volumen fijo de semen diluido a una concentración aproximada de $5-10 \times 10^6$ espermatozoides/ml para posteriormente depositar una alícuota de dicha mezcla en los pocillos pre-tratados de los porta disponibles en el kit comercial y cubrirlos con un cubreobjetos (López-Fernández y col., 2007). Estos porta se refrigeran sobre una superficie metálica durante 5 minutos para que la solución se solidifique, tras lo cual se retira el cubre y se dispone el porta horizontalmente sobre la solución de lisis del kit durante cinco minutos (López-Fernández y col., 2007). Posteriormente habrá que someter a la muestra a un lavado en agua destilada durante 5 minutos y deshidratación por inmersión en alcoholes de gradación secuencial (etanol al 70%, 90% y 100%), dos minutos en cada uno. Para visualización del daño del ADN mediante microscopia de fluorescencia (López-Fernández y col., 2007) deben teñirse las muestras con fluorocromos específicos para ADN como DAPI, Yoduro de Propidio, Bromuro de Etidio, Sybergreen o combinaciones de estos, utilizando además una solución antidifuminación (antifading).

Esta técnica presenta una muy buena correlación con otras técnicas metodológicas de evaluación de la fragmentación del ADN como el Ensayo TUNEL

o el SCSA que es la técnica de evaluación de referencia (Fernández y col., 2005; Chohan y col., 2006) con la ventaja añadida de que es una técnica mucho más simple y económica de realizar (Cortés-Gutiérrez y col., 2007). Además los kits comerciales existentes en el mercado para su uso con semen de diferentes especies han facilitado su dispersión. Todo ello ha hecho que se proponga como técnica de evaluación rutinaria de la fragmentación del ADN espermático (Cortés-Gutiérrez y col., 2007) y actualmente es la técnica más utilizada de rutina a nivel clínico.

4. Procesado de Congelación en Semen Equino

Todos los protocolos de congelación de semen equino requieren un procesado que incluye (Loomis y col., 1983; Samper y Morris, 1998; Samper, 2000):

- Dilución y centrifugación
- Adición del diluyente de congelación
- Refrigeración y/o equilibración
- Envasado
- Congelación y almacenamiento
- Descongelación del semen

4.1 Dilución y Centrifugación

En los protocolos estándar de congelación de semen equino es necesario la retirada de la mayor parte del plasma seminal por centrifugación simple (CS) y resuspensión del pellet en el diluyente de congelación con el objetivo de obtener los espermatozoides concentrados y empaquetarlos en un pequeño volumen para congelarlos (Blanchard y col., 1998).

Se sabe que parte de la variabilidad individual en la tolerancia a la congelación espermática equina se debe a diferencias en la composición del plasma seminal (Brinsko y col., 2000; Gómez-Cuétara, 2000), habiéndose identificado componentes beneficiosos para la fertilización como las proteínas secretoras ricas en cistina (CRISP), con gran variabilidad entre individuos (Leeb y col., 2005) y que juegan un papel muy importante en la fisiología espermática

evitando la capacitación prematura y facilitando la interacción con el oocito, o el colesterol que los protege durante el almacenamiento (Leeb y col., 2005). Además, en humana existen evidencias de que determinadas proteínas del plasma seminal modulan los efectos negativos de los EROs cuya producción se dispara tras la congelación-descongelación (Morrell, 2012). En équidos los resultados son contradictorios (Ortega-Ferrusola y col., 2011).

Se recomienda reducir el porcentaje de plasma seminal presente al 5-20% (Jasko y col., 1991), ya que el plasma seminal afecta negativamente a la calidad de los espermatozoides durante el almacenamiento (Jasko y col., 1991), pero participa en la modulación de la respuesta inflamatoria postcubrición que se produce en la yegua (Troedsson y col., 2000, 2005; Mari y col., 2011).

La retirada del plasma seminal se hace generalmente mediante centrifugación del semen previamente diluido 1:1, v:v o a una concentración de 50×10^6 espermatozoides/ml (Sieme y col., 2008) en el diluyente de centrifugación, a una intensidad de entre 400-600g durante 10-15 minutos (Loomis, 2006; Aurich, 2008). Los diluyentes empleados para la centrifugación son muy variados: Glucosa-EDTA (Martin y col., 1979), medio HBS (Heitland y col., 1996), aunque lo más frecuente es usar medios a base de leche desnatada y/o yema de huevo (Magistrini y Vidament, 1992; Vidament y col., 2001).

Las tasas de recuperación espermática para esta técnica están en el 75% aproximadamente (Loomis, 2006; Aurich, 2008), aunque hay autores que han reportado recuperaciones de hasta el 98% (Weiss y col., 2004). Las tasas de recuperación podrían incrementarse aumentando la fuerza o/y el tiempo de centrifugación, pero ello disminuye la calidad del semen obtenido (Loomis, 2006).

Para evitar este efecto negativo Cochran y colaboradores describieron en 1984 la Técnica de Centrifugación con Colchones (Técnica Cushion) que se basa en la adición de una solución de alta densidad específica dispuesta por debajo del semen en el tubo de centrifugación que sirve como amortiguador evitando el apelmazamiento y por tanto el daño sobre los espermatozoides durante la centrifugación. Este método permite el incremento de la fuerza de centrifugación (1000g durante 20 minutos) aumentando con ello la tasa de recuperación al 90% sin afectar gravemente la calidad seminal (Revell y col., 1997; Ecot y col., 2005; Knop y col., 2005).

Inicialmente se utilizaron como soluciones colchón soluciones de glucosa-EDTA que pasaron a sustituirse por diluyentes con yema de huevo y glicerol (al 4%) (Amman y Picket, 1987). Hoy en día se usan soluciones densas con Iodixanol al 60% (Revell y col., 1997).

4.2 Adición del Diluyente de Congelación: Crioprotectores y Diluyentes

Tras la centrifugación se debe resuspender el pellet en un diluyente de congelación en el volumen y concentración adecuado según el procedimiento (Jasko, 1994; Blanchard y col., 1998). Los diluyentes de congelación de semen están compuestos por diferentes sustancias como son crioprotectores, azúcares, soluciones tampón, antibióticos y electrolitos entre otros (Blanchard y col., 1998) que cumplen las siguientes funciones: proveer nutrientes como fuente de energía, proteger a los espermatozoides de la bajada de temperatura y el procesado, mantener un adecuado equilibrio del pH, mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico e inhibir el crecimiento bacteriano (Hafez, 2000).

4.2.1 Crioprotectores:

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles que disminuyen el punto eutéctico de la solución a la que se incorporan. El punto eutéctico es la temperatura más baja a la cual se puede fundir una mezcla de solutos con una composición fija. La disminución del mismo permite una mayor deshidratación de la célula espermática disminuyendo el gradiente osmótico al que dicha célula es sometido, es decir, se alcanza la misma concentración de solutos a una temperatura menor, por lo que la célula queda más protegida (Fabbri y col., 1998).

Según Keith (1998) los crioprotectores se clasifican en dos grupos:

- No permeables (lípidos, lipoproteínas y macromoléculas de yema de huevo, leche, azúcares...)
- Permeables (glicerol, etilenglicol, amidas, DMSO...)

4.2.1.1 Crioprotectores No Permeables

Los crioprotectores no permeables son compuestos de elevado peso molecular que no atraviesan la membrana plasmática, por lo que su efecto protector lo desarrollan en el medio extracelular a través de mecanismos osmóticos favoreciendo un medio hipertónico que hace que salga agua de la célula (deshidratación), disminuyendo así la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares (Aisen y col., 2000, 2002; Moore y col., 2006).

4.2.1.1.1 Azúcares

De forma natural el plasma seminal presenta una serie de azúcares como son la glucosa, fructosa y el sorbitol (Mann, 1975). De entre ellos la glucosa y la fructosa son los azúcares más empleados en los diluyentes de congelación de semen en animales (Yildyz y col., 2000; Aboagla y Terada, 2003), aunque el sorbitol se utiliza también para la criopreservación de semen en el toro y en el hombre (García y Graham, 1989; Álvarez y Storey, 1993). Un estudio reciente en semen equino demuestra la superioridad de su efecto crioprotector frente a los otros dos (Pojprasath y col., 2011).

El uso de otros azúcares como la metilcelulosa no ha mostrado tan buen efecto crioprotector (Squires y col., 2004) y siempre necesita su combinación con otros crioprotectores (Dalimata y Graham, 1997).

4.2.1.1.2 Leche Desnatada

Las caseínas, fosfocaseínas y las beta lactoglobulinas procedentes de la leche son compuestos orgánicos que presentan una función protectora frente al estrés por frío (Holt, 2000; Aurich y col., 2007) sirviendo la leche desnatada en polvo o entera homogeneizada como constituyente básico del diluyente o formando parte en pequeñas cantidades de diluyentes sintéticos (Aurich y col., 2007), aunque no está clara la naturaleza de su mecanismo crioprotector (Salisbury y col., 1978).

4.2.1.1.3 Yema de Huevo

Los fosfolípidos y lipoproteínas procedentes de la yema de huevo son compuestos orgánicos que presentan una función protectora frente al daño desencadenado en la congelación espermática (Gebauer y col., 1970; Jones y Martin, 1973; Holt, 2000). La yema de huevo que tradicionalmente se ha usado en los diluyentes de semen es de gallina, aunque también se ha probado la utilización de yema de huevo de otras especies como pato y oca con buenos resultados (Trimeche y col., 1997; Clulow y col., 2007).

Hoy en día se sabe que la fracción de lipoproteínas con efecto crioprotector en la yema de huevo es la fracción de baja densidad (LDLs) aunque no se conoce aún su mecanismo de acción crioprotector (Pace y Graham, 1974; Watson y Martin, 1975; Jiang y col., 2007; Bencharif y col., 2008; Hu y col., 2010).

4.2.1.2 Crioprotectores Permeables

Son compuestos de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana que producen una reorganización de los componentes lipídicos y proteicos de esta que hace incrementar su fluidez, favoreciendo la deshidratación celular a bajas temperaturas y disminuyendo la formación de cristales de hielo intracelulares, lo que incrementa la supervivencia espermática a la congelación (Holt, 2000). Actúan tanto en el medio intracelular como extracelular (Keith, 1998).

4.2.1.2.1 Glicerol

El glicerol fue descubierto por Polge y colaboradores en 1949 y desde entonces se convirtió en el crioprotector de elección para la criopreservación de semen en muchas especies, entre ellas los équidos (Silva y col., 2002; Alvarenga y col., 2005; Buranaamnuay y col., 2011).

Es todavía el crioprotector más usado pero no existe uniformidad en cuanto a su concentración óptima en los diluyentes comerciales equinos, que varía del 2,5 al 7% (Pace y Sullivan, 1975; Martin y col., 1979; Tischner, 1979; Palmer, 1984; Loomis y col., 1983; Wilhelm y col., 1996a, 1996b; Leipold y col., 1998; Vidament y col., 2000, 2001; Loomis y Graham, 2008). En cualquier caso depende de la composición del diluyente y del porcentaje de yema de huevo del mismo (Ecot y col., 2000).

Además presenta un claro efecto negativo pudiendo ser uno de los factores implicados en la baja motilidad y fertilidad postdescongelación que ha sido descrito en aves pero también en équidos (Fahy y col., 1990; Burns y Reasner, 1995; Vidament, 2005). Su efecto tóxico causa alteraciones citoplasmáticas, en la membrana, en las proteínas superficiales que intervienen en la señalización celular, en la polimerización tubular y en la asociación de microtúbulos, además de provocar desnaturalización de proteínas (Fahy y col., 1990; Hammerstedt y Graham, 1992).

La sensibilidad de los espermatozoides al glicerol es especie dependiente (Curry, 2000), estando completamente contraindicado su uso en algunas especies como en el burro (Álvarez y col., 2004; Crespo, 2005) o el gallo (Chalah y col., 1999; Tselutin y col., 1999). En équidos se ha visto que se producen efectos tóxicos si se usa en concentraciones mayores o iguales al 2,5% (Bedford y col., 1995) o 3,5% (Vidament y col., 2005), pero hay que tener en cuenta que la concentración final de glicerol dependerá de la dilución usada semen:diluyente (Vidament, 2005). Además también existe variabilidad individual respecto a la tolerancia al glicerol entre sementales (Alvarenga y col., 2003), que podría estar relacionada en parte con la variabilidad en la fluidez de membrana de los espermatozoides ya que se sabe que el glicerol afecta directamente a esta fluidez (Hammerstedt y Graham, 1992).

El principal efecto tóxico del glicerol parece estar desencadenado por el estrés osmótico producido durante su incorporación y eliminación en las fases de congelación y descongelación (Gao y col., 1995; Ball y Vo, 2001; Squires y col., 2004), por lo que se ha propuesto el uso de crioprotectores alternativos permeables de menor peso molecular y viscosidad y mayor permeabilidad que desencadenan un menor estrés osmótico y una menor formación de cristales de hielo intracelulares (Ogier y col., 1999; Ball y Vo, 2001; Squires y col., 2004; Bianchi y col., 2008).

4.2.1.2.2 Crioprotectores Permeables Alternativos

Entre estos crioprotectores alternativos destacan los pertenecientes al grupo de las amidas que han sido utilizadas como crioprotectores de semen únicos o en combinaciones con glicerol en cánidos (Futino y col., 2010), porcino (Bianchi y col., 2008), aves (Tselutin y col., 1999), peces (Ogier y col., 1999) y équidos (Fahy y col., 1990; Alvarenga y col., 2000a; Graham, 2000; Medeiros y col., 2002; Squires y col., 2004) para disminuir el efecto tóxico del glicerol y mejorar la motilidad, viabilidad y fertilidad del semen congelado-descongelado.

Las amidas que mejores resultados han dado para su uso como crioprotectores en semen equino son la dimetilformamida (DMF) y metilformamida (MF) con un peso molecular de 73,09g/mol 50,07g/mol respectivamente (Alvarenga y col., 2005).

Los primeros estudios que utilizaron las amidas como crioprotectores alternativos al glicerol en la congelación de semen equino mostraron una superioridad o igualdad al glicerol, principalmente DMF y MF (Alvarenga y col., 2000a; Graham, 2000; Squires y col., 2004), encontrándose además que la acetamida resultó tóxica (Graham, 2000). Estudios posteriores, encabezados por investigadores brasileños, han encontrado una superioridad en la utilización de las amidas solas o en combinación con glicerol como crioprotectores de semen equino respecto al uso del glicerol de forma exclusiva (Gomes y col., 2002; Medeiros y col., 2002; Moffet y col., 2003; Alvarenga y col., 2005; Morillo Rodríguez y col., 2012).

Sin embargo, otros autores no han encontrado tal superioridad, al obtener los mismos resultados con el uso de glicerol como crioprotector único (Vidament y col., 2002).

El uso de otras amidas como la acetamida, formamida, dimetilamida y metilacetamida como crioprotectores de semen equino no ha dado buenos resultados (Graham, 2000; Squires y col., 2004), probablemente por su mayor peso molecular (Alvarenga y col., 2005).

Además parece que el uso de amidas como crioprotectores incrementa la viabilidad del semen equino en el tracto genital femenino con respecto al glicerol y mejora la fertilidad del semen criopreservado respecto al uso de glicerol incluso en équidos con buena tolerancia a la criopreservación (Alvarenga y col., 2003). Su uso permite reducir la variabilidad individual y racial en la motilidad e integridad de la

membrana en los análisis postdescongelación, mejorándose estas características principalmente en caballos clasificados como “malos congeladores” (Alvarenga y col., 2003, 2005).

El uso de otros crioprotectores permeables alternativos al glicerol como aquellos pertenecientes al grupo de los alcoholes (Ashwood-Smith, 1987) no ha sido tan estudiado para el semen equino. Para el dimetil-sulfóxido (DMSO) destaca el trabajo de Ball y Vo (2001) que determina su efecto osmótico, o el de Chenier y colaboradores (1998) quienes obtuvieron mejores resultados con DMSO que con glicerol en un grupo de sementales que no congelaban bien con el glicerol. Sin embargo, el estudio de Alvarenga y colaboradores (2000a) determinó que el DMSO no era efectivo para proteger a los espermatozoides equinos del daño sufrido durante el proceso de criopreservación. En el caso del etilenglicol varios autores lo han propuesto como sustituto del glicerol sólo o en combinación con éste a las mismas concentraciones que las usadas con el glicerol con efectos crioprotectores similares (Alvarenga y col., 2000b; Henry y col., 2002; Squires y col., 2004).

4.2.2 Diluyentes de Congelación:

La mayoría de los diluyentes de congelación seminal tradicionalmente usados se basaban en el diluyente de semen descrito por Kenney y colaboradores en 1975 y presentaban una mezcla de sales minerales, azúcares, EDTA, yema de huevo y/o leche desnatada y glicerol. Entre ellos destacan el Lactosa-EDTA y posteriores modificaciones del mismo (Martin y col., 1979; Tischner, 1979); o las adaptaciones del INRA82® (Palmer, 1984; Magistrini y Vidament, 1992) cuyas composiciones pueden verse en la Tabla 2.

	a) modified lactose EDTA (Martin et al., 1979)		b) lactose EDTA egg yolk (Tischner, 1979)		c) INRA82 for freezing (Palmer, 1984)		d) Modified INRA82 (Magistrini et al., 1992)		
Centrifugation medium	Glucose	6.0 g	Lactose	11 g	INRA82	Glucose	2.5 g	Glucose	2.5 g
	Na ₂ -EDTA	370 mg	EDTA	100 mg		Lactose	150 mg	Lactose	150 mg
	Na-citrate	375 mg	Na-citrate	89 mg		Raffinose	150 mg	Raffinose	150 mg
	Na-bicarbonate	120 mg	Na-bicarbonate	8 mg		Na-citrate	30 mg	Na-citrate (5.5 H ₂ O)	30 mg
	Streptomycin	50 mg	Streptomycin	50 mg		K-citrate	41 mg	K-citrate (H ₂ O)	41 mg
	Penicillin	50 IU	Penicillin	50 IU		Gentamycin	5 mg	Hepes	476 mg
	Distilled water	100 mL	Egg yolk	1.6 g		Penicillin	500 IU	Gentamycin	50 IU/mL
Freezing medium	Lactose (11%, w/v)	50 mL	Glycerol	3.5 mL	Distilled water	50 mL	Penicillin	50 IU/mL	
	Centrifugation medium	25 mL	Distilled water	100 mL	UHT sterilized skimmed milk	50 mL	Distilled water	50 mL	
	Egg yolk	20 mL			Centrifugation medium	INRA82 + 2% egg yolk	UHT skimmed milk	50 mL	
	OrvusEs paste	0.8 mL			Freezing medium	INRA82 + 2% egg yolk + 2.5% glycerol	pH	7.1	
	Glycerol	5 mL							

Tabla 2. Composición de los diluyentes de congelación de semen equino tradicionales (extraído de Hoogewijs, 2010).

El uso de productos de origen animal presenta una serie de riesgos y limitaciones sanitarias además de una serie de complicaciones técnicas (Pillet y col., 2011, 2012) que han determinado que la investigación se haya centrado en su sustitución por otros medios o sustancias con dichas características protectoras.

En este sentido, a partir del INRA82®, diluyente cuya base es la leche desnatada, se produjo el diluyente comercial INRA96® que sustituía la leche por la fracción purificada de las caseínas presentes en la leche. La utilización del diluyente INRA96® modificado (suplementado con 2% de yema de huevo y 2,5% de glicerol) para la congelación de semen equino mostró mejores resultados que la del INRA82® para congelar (Pillet y col., 2008).

Lo mismo ha ocurrido con el uso del huevo en los diluyentes de congelación, ya que su incorporación en forma de yema de huevo completa supone una serie de problemas por la posible introducción de entotoxinas que podrían dañar los espermatozoides (Bousseau y col., 1998; Gil y col., 2003) y por su elevada composición lipídica y presencia de partículas groseras que interfieren en el análisis seminal (Watson y Martin, 1975). Todo ello ha determinado que se hayan realizado estudios con yema de huevo clarificada mediante ultracentrifugación a 1000g (Pace y Graham, 1974; Torres-Boggino y col., 1995), incorporada en el diluyente Kenney's modificado de 1992 (Burns, 1992) o en el Gent®. O con plasma de yema de huevo esterilizada obtenido por ultracentrifugación, que ha mostrado aportar las mismas características postdescongelación *in vitro* y de fertilidad *in vivo* que la yema de huevo completa (Pillet y col., 2011). Este último estudio dio como resultado la creación del diluyente comercial InraFreeze® a partir del INRA96® modificado, en el que la yema de huevo completa era sustituida por el plasma de huevo esterilizado, creando este diluyente comercial listo para su uso y sin riesgos sanitarios (Pillet y col., 2011).

El equipo francés ha continuado con la investigación e identificación de los liposomas y lipoproteínas crioprotectoras presentes en la yema de huevo para su futura incorporación en los diluyentes comerciales de congelación de semen equino, aunque aún queda profundizar el estudio en este campo (Pillet y col., 2012).

También se ha investigado en la sustitución de estos productos de origen animal por otros de origen vegetal como las lecitinas de soja que han sido estudiadas para la criopreservación de semen de toro (Aires y col., 2003), habiéndose realizado diluyentes comerciales de congelación de semen como el AndroMed®. Sin embargo, el reemplazo en el diluyente INRA82® modificado de la yema de huevo por lecitinas de soja no produjo diferencias significativas ni en las características postdescongelación ni en las tasas de fertilidad (Ricker y col., 2006).

Todos los diluyentes comerciales de congelación para semen equino previamente citados presentan glicerol como crioprotector. En este sentido investigadores brasileños han estudiado la incorporación de amidas en sus diluyentes de congelación encontrando una superioridad de estos frente a diluyentes que presentan únicamente glicerol (Gomes y col., 2002; Medeiros y col., 2002; Papa y col., 2002; Alvarenga y col., 2005).

A partir de estas investigaciones se creó el diluyente comercial Botucurio® que presenta un 1% de glicerol y un 4% de MF como crioprotectores además de yema de huevo (Melo y col., 2007; Terraciano y col., 2008). En el caso del Botucurio® la sustitución de la yema de huevo por lecitinas de soja no obtuvo buenos resultados al no mejorarse las características postdescongelación e incluso afectar negativamente las tasas de fertilidad (Papa y col., 2010).

4.3 Equilibrado, Refrigeración, Congelación y Almacenamiento

En una gran mayoría de los casos es necesaria una fase de refrigeración y equilibrado tras resuspender las células espermáticas en el diluyente de congelación (Sieme y col., 2008) para permitir una cierta deshidratación y estabilización de las células espermáticas, debido a las diferencias de permeabilidad y peso molecular de los crioprotectores respecto a las soluciones fisiológicas (Papa y col., 2002). En cuanto a las tasas o curvas de congelación para semen equino, presentan unos rangos de entre los 20° a los 100°C por minuto (Devireddy y col., 2002a, 2002b). En cualquier caso, tanto las tasas de equilibrado y refrigeración como las de congelación deben adaptarse a la composición del medio de congelación utilizado (tipo y concentración de crioprotectores principalmente) para optimizar los resultados obtenidos.

El protocolo de congelación inicialmente propuesto por Palmer en 1984 para el diluyente INRA82® determinaba la dilución del semen en INRA82® + 2% yema de huevo a 37°C, enfriamiento hasta 22°C en 10 minutos, refrigeración hasta 4°C en 60 minutos (velocidad de -0,55°C/min) y centrifugación a 4°C para

posteriormente resuspender el pellet en el INRA82® de congelación (INRA82® + 2% yema de huevo + 2,5% glicerol) dejando que se equilibrara a esta temperatura durante 50-60 minutos para proceder a la congelación mediante congelador automático a una tasa de $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los -140°C o disponiendo las pajuelas a 4cm sobre vapores de nitrógeno líquido durante 10 minutos, para posteriormente sumergirlas en el nitrógeno líquido. A partir de este protocolo se fueron haciendo modificaciones (Vidament y col., 2000) para finalizar recomendando una primera dilución en INRA82® + 2% yema de huevo a 37°C , centrifugación y adición del diluyente de congelación (INRA82® de congelación) a 22°C , refrigeración lenta en 80 minutos hasta 4°C ($-0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$), empajuelado a 4°C y congelación durante 10 min a 4 cm sobre vapores de nitrógeno o en congelador programable a $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los -140°C para posteriormente sumergir las pajuelas en el nitrógeno líquido (Vidament y col., 2001). Este mismo protocolo es el sugerido para los diluyentes de congelación del grupo francés que se desarrollaron posteriormente: el INRA96® modificado para congelar (INRA96® + yema de huevo + glicerol) y el diluyente comercial INRAFREEZE®.

En cuanto al diluyente Lactosa-EDTA modificado (Martin y col., 1979), tras la centrifugación, dilución y el equilibrado a 22°C , se describe proceder a la congelación directa de las pajuelas en vapores de nitrógeno líquido a una velocidad de $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ o en congelador automático y posterior inmersión en el nitrógeno sin periodo de refrigeración o equilibrado previo (Silva y col., 1997), aunque también se han propuesto periodos de refrigeración previa lentos de aproximadamente $-0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Heitland y col., 1996).

Como en el caso del diluyente Lactosa-EDTA, para el diluyente GENT® se han estudiado protocolos con curvas de congelación rápida sin pasar por periodo de refrigeración previo (Vlasiu y col., 2008) o bien curvas de refrigeración lentas con periodo de refrigeración hasta los 5°C a -0,3/-0,5°C/min y posterior congelación (Miró y col., 2003; Vlasiu y col., 2008).

Para el diluyente Botucio®, que incorpora como crioprotectores la amida metilformamida además de glicerol, se recomienda un periodo de refrigeración de 20 minutos a 5°C previo a la congelación para optimizar las características seminales postdescongelación obtenidas (Alvarenga y col., 2005). Posteriormente se suelen usar las mismas curvas de congelación citadas anteriormente, -60°C/min para después sumergir las pajuelas en el nitrógeno líquido, aunque se han usado velocidades de congelación de hasta -70°C/min sin que disminuya la capacidad crioprotectora de las amidas (Alvarenga y col., 2005).

4.3.1 Sistemas de Congelación:

4.3.1.1 Sistema Convencional en Nitrógeno Líquido

El sistema convencional de congelación recomienda disponer las pajuelas horizontalmente 3-6 cm por encima del nivel de nitrógeno (en vapores) durante 7-20 minutos (Amann y Pickett, 1987; Vidament y col., 2001; Papa y col., 2002), habiendo una variación en el ritmo de congelación según la altura a la que se coloquen, aunque generalmente la velocidad es alta y de alrededor de -60°C/min (Amann y Pickett, 1987) y al llegar a -140°C sumergirlas en el nitrógeno a -196°C (Cochran y col., 1984).

Este sistema presenta las ventajas de ser económico, sencillo y requerir un menor coste de equipamiento y de gasto de nitrógeno líquido (Clulow y col., 2007).

4.3.1.2 Sistema Automatizado de Congelación

Existen sistemas automatizados de congelación y en este caso normalmente se usan curvas de congelación que combinan varias velocidades, de $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre los 20°C y los -15°C y una segunda velocidad entre los -15°C y los -120°C de unos $-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Cristanelli y col., 1985; Magistrini y Vidament, 1992; Samper y Morris, 1998) para luego sumergir las pajuelas en nitrógeno líquido. En este sistema la tasa de congelación es más uniforme al tener un mayor control de la temperatura (Barros y col., 2008) lo que se ha relacionado con una mayor calidad seminal postdescongelación respecto a la congelación con el sistema convencional (Clulow y col., 2007). Algunos autores no han encontrado diferencias entre ambos sistemas de criopreservación (Cristanelli y col., 1985).

4.3.1.3 Otros Sistemas de Congelación

El Sistema de Congelación Rápida UFT, desarrollado inicialmente para la industria alimentaria, pero usado posteriormente en muestras seminales, obtiene valores de motilidad progresiva postdescongelación similares a los obtenidos con el sistema convencional en nitrógeno líquido (Goolsby y col., 2004). El Sistema Multigradiente Térmico MTG, del que se disponen datos limitados sobre fertilidad (Arav y col., 2002) o la Ultracongelación a -152°C (Álamo y col., 2005).

4.4 Envasado

El envasado se puede realizar en macropajuelas de 4 ó 5ml (Martin y col., 1979; Blanchard y col., 1998; Love y col., 1989; Samper y Morris 1998), en micropajuelas de 1ml (Cochran y col., 1983), en pajuelas de 0,5ml que es lo más frecuente (Loomis y col., 1983) o en pajuelas de 0,25ml. El enfriamiento es más uniforme y eficiente en las micropajuelas, principalmente en las de 0,5ml para semen equino (Graham, 1996), aunque se requieren varias pajuelas para completar una dosis de inseminación. Nascimento y colaboradores (2008) no encontraron diferencias en las características espermáticas postdescongelación entre las dosis de semen equino congeladas en pajuelas de 0,5ml o 0,25ml.

4.5 Descongelación

Existen varios protocolos de descongelación de dosis seminales (Vidament y col., 2001), pero en cualquier caso dependen del sistema de envasado y de la velocidad de congelación (Samper, 2000). Normalmente se recomiendan protocolos de descongelación de las micropajuelas mediante inmersión en baño a 37°C durante 0,5 o 1 minutos (Loomis y col., 1983; Vidament y col., 2001) aunque algunos autores han propuesto temperaturas mayores de 75°C durante 7 segundos seguidos de al menos 15 segundos a 37°C (Cochran y col., 1984). Para las macropajuelas de 5 o 2,5ml se usan temperaturas de 50°C durante 45 segundos (Martin y col., 1979; Heitland y col., 1996; Samper y Morris, 1998).

6. Técnicas de Selección Espermática

A diferencia de las técnicas de separación espermática que sólo separan los espermatozoides del plasma seminal, las técnicas de selección espermática seleccionan además una subpoblación de espermatozoides según sus características (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2009), imitando en cierta medida los métodos de selección espermática naturales del tracto reproductivo de la yegua que tienen como objetivo permitir que sólo los espermatozoides morfológicamente normales, con membranas intactas y cromatina espermática íntegra pasen a través del oviducto y fertilicen el/los oocito/s (Morrell, 2012).

Existen varios métodos de selección espermática:

- Técnicas de Migración Espermática (Swim Up, Swim Down)
- Técnicas de Adherencia Espermática (Woll glass, Glass beads, Sephadex filtration)
- Técnicas de Centrifugación Coloidal

6.1 Técnicas de Migración Espermática

Se basan en la habilidad de los espermatozoides móviles de moverse o migrar activamente hacia un medio selectivo de diferente composición al que se encuentran (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2009). Los espermatozoides son seleccionados por tanto en base a su motilidad y no a su morfología, integridad del acrosoma o cromatina o viabilidad (Sonfai y col., 2002).

Según donde situemos la población espermática original (semen diluido) respecto al medio selectivo (encima/debajo del mismo) se diferenciará entre la técnica Swim up y Swim down respectivamente. El problema es que las tasas de recuperación espermática son muy bajas (10-20%) por lo que esta técnica sólo es útil en los casos en que se requiera un muy bajo número de espermatozoides motiles (IVF, ICSI o IA histeroscópica de baja dosis) (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2009). Además clásicamente esta técnica se aplicaba sobre el pellet obtenido tras centrifugación lo que afectaba negativamente la calidad resultante no sólo por la técnica de centrifugación en sí sino también porque en el pellet resultante los espermatozoides se concentraban junto a detritus que favorecen la liberación de EROs (Henkel y Schill, 2003). Para evitar este efecto se desarrolló la técnica sobre semen diluido.

A la técnica de migración swim up sobre semen diluido puede combinarse una técnica de sedimentación, con una selección de espermatozoides mótils buena pero de uso menos extendido y cuyo rendimiento sigue siendo bajo (Henkel y Schill, 2003).

6.2 Técnicas de Adherencia Espermática (Filtración)

Esta técnica fue descrita por primera vez por Paulson y Polakoski en 1977. Se basa en la mayor tendencia que presentan los espermatozoides muertos o dañados de adherirse a los gránulos de polisacáridos que forman los filtros (Stubblings y Wosik, 1991; Crabo y col., 1992), dejando que los espermatozoides con la membrana plasmática y acrosomal intactas pasen a través de las columnas de

polisacáridos, incrementando por tanto la calidad de la muestra resultante (Bussalleu y col., 2008). En équidos esta técnica se ha correlacionado con aumento de la fertilidad (Choi y col., 2006).

Se pueden procesar grandes volúmenes de semen pero uno de los problemas más importantes es que estas columnas permiten el paso de detritus, leucocitos y del plasma seminal, por lo que se necesita una centrifugación posterior para concentrar los espermatozoides (Henkel y Schill, 2003) o utilizar filtros que permitan incrementar la concentración espermática (Alvarenga y col., 2010).

6.3 Técnicas de Centrifugación Coloidal (CC)

Dentro de las técnicas de selección espermática ésta es la única usada de rutina en la clínica reproductiva equina (Morrell, 2012) y de la que existen más estudios. En este tipo de técnicas se utiliza una suspensión de partículas coloidales que se coloca en un tubo de centrifugación formando un gradiente continuo o dos capas (una con un 40-45% de coloide y otra con un 80-90% de coloide). Sobre éstas se coloca el semen y se procede a la centrifugación haciendo que los espermatozoides se separen en subpoblaciones con diferentes gravedades específicas, según su punto isopícnico (Pretlow y Pretlow, 1989; Edmond y col., 2012) de modo que la mayoría de los espermatozoides normales pasarán a través de estos gradientes y se situarán en el pellet en el fondo del tubo mientras que la mayoría de los espermatozoides no móviles o anormales, células germinales prematuras, otras células, plasma seminal y diluyente utilizado se quedarán o en la interfase entre los dos gradientes o sobre estos (Edmond y col., 2012).

Este tipo de gradientes de densidad presentan más ventajas que otros métodos de separación espermática puesto que (Edmond y col., 2012):

- Las partículas de sílice no penetran en las membranas espermática, por lo que no causan tanto estrés osmótico.
- Pueden formularse para crear medios de gravedad específica muy elevada.
- Tienen una baja viscosidad que no impide la sedimentación de los espermatozoides seleccionados.

Al principio comenzaron por utilizarse coloides consistentes en partículas de sílice recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP) como el Percoll® que se mezclaba con soluciones de sales para lograr diferentes densidades para formar el gradiente de densidad (Morrell, 2012).

Sin embargo, la potencial toxicidad potencial de los PVP para los espermatozoides y la elevada presencia de endotoxinas en algunos lotes restringió su uso a fines no clínicos desde el año 1996 (Avery y Greve, 1995; Mortimer, 2000), limitando la difusión a gran escala de la centrifugación con gradientes de densidad en esta primera fase (Sieme y col., 2003; Loomis, 2006).

A mitad de los años 90 se desarrollaron los coloides de partículas de sílice recubiertas de silano (PureSperm®, Androcoll-E®, Equipure®) que presentan unos niveles mucho más bajos de endotoxinas que las partículas de sílice recubiertas con PVP (Morrell, 2012).

Estos coloides son estables por largos periodos de tiempo en soluciones salinas y además pueden autoclavarse, lo que permitió la comercialización de productos preparados para su uso inmediato, ahorrando tiempo y homogenizando los lotes (Mortimer, 2000). Muchos estudios demostraron que estos productos son una buena alternativa al Percoll® (Centola y col., 1998; Claassens y col., 1998; Mousset-Simeon y col., 2004).

Para su procesado se coloca en primer lugar la capa de mayor densidad, encima de ésta la de menor densidad y después se coloca con cuidado el semen encima del coloide. Es mejor esta opción que inyectar el coloide debajo del semen por dos razones (Morrell, 2012):

- Colocar el semen en el fondo del tubo permite que los espermatozoides muertos, bacterias y otras fuentes de contaminación se peguen al fondo, en el lugar que posteriormente pasará a depositarse el pellet, lo que podría contaminar a los espermatozoides posteriormente seleccionados.

Una eficiente selección sólo es factible si se logran una interfase clara entre el coloide y el semen antes de la centrifugación. Al inyectar el coloide bajo el semen se pierde integridad de esta interfase.

Entre estos productos de CC está el EquiPure® que presenta un pH de 7,4-7,8, una osmolaridad de entre 300-320mOsm/Kg y unos niveles de endotoxinas menores a 1UE/ml. Su incorporación en el protocolo de congelación de semen de caballos de razas como la PRE podría incrementar el éxito de esta técnica de manera considerable.

El problema es que los protocolos comerciales originales para equinos eran difícilmente aplicables a la clínica ya que determinaban el uso de 2 ml de Bottom Layer, 2 ml de Top Layer y 1 ml de semen equino diluido con una concentración máxima de 250 millones/ml, utilizando para su centrifugación tubos de 15 ml o para grandes volúmenes de semen describían un protocolo con 5 ml de Bottom Layer, 5 ml de Top Layer y 5 ml de semen equino diluido con una concentración máxima de 250 millones/ml para centrifugar en tubos de 50 ml. Tras la colocación del coloide y del semen los tubos se centrifugan 20 min a 300g eliminándose el sobrenadante y recuperando el pellet.

Por este motivo y por el tiempo y trabajo que llevaba preparar las diferentes capas comenzó a estudiarse la centrifugación coloidal monocapa como alternativa para procesar semen animal (Sieme y col., 2003; Morrell y col., 2008a, 2008b, 2009a, 2009b, 2009c; Thys y col., 2009; Edmond y col., 2012).

En reproducción asistida humana estos sistemas de selección espermática a través de la CC son muy utilizados para incrementar la capacidad fecundante de una muestra (Pertoft, 2000; Edmond y col., 2012). En la clínica reproductiva equina puede ser muy útil si estamos ante un eyaculado de baja calidad o que se ha dañado durante la refrigeración/congelación (Sieme y col., 2003; Loomis, 2006; Edmond y col., 2012), lo que hace que su uso esté recomendado para las técnicas de reproducción asistida y para aumentar la fertilidad de sementales subfértiles (Geraghty, 2006; Edmond y col., 2008; Varner, 2008).

Los sistemas de CC permiten seleccionar los mejores espermatozoides (mejor morfología, motilidad y/o integridad de la cromatina espermática), incrementando la calidad seminal tanto para semen humano (Sakkas y col., 2000; Tomlinson y col., 2001; Brahem y col., 2011; Jayaraman y col., 2012), como semen equino en fresco (McPherson y col., 2002; Edmond y col., 2008; Johannisson y col., 2009; Morrell y col., 2009a, 2009b, 2009c, 2009d, 2012; Mari y col., 2011; Macías García y col., 2012b), refrigerado (Morrell y col., 2009e, 2011a) y criopreservado con centrifugación coloidal antes de la congelación (Mancill y col., 2010; Hoogewijs y col., 2011; Macías García y col., 2012b) o tras descongelar (Macías García y col., 2009a, 2009b; Mancill y col., 2010; Stuhmann, 2011). También se han utilizado para eliminar agentes patógenos del semen humano (Englert y col., 2004) y equino (Geraghty, 2006; Morrell y Geraghty, 2006; Johannisson y col., 2009; Ortega-Ferrusola y col., 2009).

En los últimos años se han incrementado el número de publicaciones sobre estudios de fertilidad *in vivo* evaluando el efecto de la centrifugación coloidal en semen equino. Son varios autores los que han determinado el aumento de las tasas de gestación principalmente en équidos subfértiles (Varner y col., 2008; Ayuso-Hernando y col., 2011; Mari y col., 2011; Morrell y col., 2010a, 2011a, 2012; Macías García y col., 2012b). Sin embargo, Cerny y colaboradores (2012) no encontraron diferencias en las tasas de gestación entre dosis de semen de sementales con fertilidad normal descongeladas y seleccionadas por CC respecto a las no seleccionadas.

También, se ha investigado el efecto de añadir plasma seminal después de la CC. Morrell y colaboradores (2012) determinaron que las características seminales respecto a la motilidad tras la centrifugación coloidal mejoraban si se añadía un 5% de plasma seminal, sin embargo se afectaba negativamente los índices de fragmentación del ADN haciéndolos algo mayores e incrementándose más rápidamente en el tiempo si se añadía plasma seminal tras la centrifugación coloidal. La calidad seminal se veía fuertemente comprometida si se añadía plasma seminal en porcentajes por encima del 10% tras la CC (Morrell y col., 2010b, 2012). Así mismo, cuando se han estudiado las tasas de gestación se ha visto un efecto negativo en el hecho de añadir plasma seminal tras la centrifugación CC (Mari y col., 2011).



Foto 2. Foto detalle del producto de centrifugación coloidal Equipure® (Bottom Layer)



Foto 3. Foto detalle de la deposición del semen diluido sobre el coloide.



Foto 4. Foto detalle de la separación limpia entre el semen y el coloide tras la deposición.

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS

Nuestro objetivo general fue estudiar **la optimización las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal**, específicamente a través de la técnica de selección espermática de centrifugación coloidal incrementando el éxito obtenido con ella. Para ello propusimos los siguientes objetivos particulares:

- Estudiar la posibilidad de adaptar un protocolo de centrifugación coloidal del semen equino con EquiPure® que hiciera viable su uso en la mayoría de los Centros de Reproducción **(Artículo 1)**.
- Comparar el efecto y capacidad selectiva de la centrifugación simple y la centrifugación coloidal monocapa sobre la integridad de la cromatina espermática (sDFI) durante su evaluación dinámica, por incubación a 37°C durante 24 horas **(Artículo 2)**.
- Comparar el efecto de dos protocolos de centrifugación coloidal monocapa antes de la criopreservación de semen equino en combinación con tres diluyentes de congelación comerciales sobre los valores de integridad de la cromatina espermática a diferentes tiempos de incubación a 37°C (Evaluación Dinámica de la Fragmentación del ADN Espemático) **(Artículo 3)**.

- Estudiar si el uso de la centrifugación coloidal monocapa aplicada antes de una Prueba de Congelación clínica podría incrementar el número de caballos o eyaculados adecuados para su procesamiento en criopreservación, observando el efecto del protocolo de centrifugación y diluyente de congelación sobre la motilidad espermática post-descongelación **(Artículo 4)**.

CAPÍTULO 4: ARTÍCULO 1





Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure

L. Gutiérrez-Cepeda^{a,*}, A. Fernández^a, F. Crespo^b, J. Gosálvez^c, C. Serres^a

^a Animal Medicine and Surgery Department, Veterinary Faculty, UCM, Avda. Puerta de Hierro s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

^b Centro Militar de Cría Caballar, (FESCCR-Ministerio de Defensa), C/Arsenio Gutiérrez Palacios s/n, 05005 Ávila, Spain

^c Biology Department, Genetic Unity, UAM, C/Darwin 2, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2010

Received in revised form 4 January 2011

Accepted 1 February 2011

Available online 16 February 2011

Keywords:

Colloidal centrifugation

Equine semen processing

EquiPure™

ABSTRACT

For many years in human assisted-reproduction procedures there have been special protocols to prepare and improve sperm quality. Colloidal centrifugation (CC) is a useful technique that has been proved to enhance semen quality by selection of the best spermatozoa for different species. Its use is recommended to improve fertility of subfertile stallions but current CC protocols are clinically complicated in the equine sperm processing technique due to economic and technical difficulties. The aim of this study was to determine the optimal processing procedures to adapt the use of a CC product (EquiPure™) in the equine reproduction industry.

A total of nineteen ejaculates were collected from 10 Purebred Spanish Horses (P.R.E horses) using a Missouri artificial vagina. Gel-free semen aliquots were analyzed prior to treatment (control). Semen was subjected to one of six CC protocols with EquiPure™ and centrifuged samples were statistically evaluated by ANOVA and Duncan tests ($p < 0.05$) for sperm quality and recovery rate.

We obtained higher values by colloidal centrifugation in LIN, STR and BCF variables and DNA fragmentation index trended to be lower in most of the CC protocols. The studied protocols were shown to be as efficient in improving equine sperm quality as the current commercial EquiPure™, with the added advantage of being much more economical and simple to use.

According to these results it seems to be possible to incorporate single layer and or high colloidal centrifugation volume protocols what would make them simple, economic and clinically viable for the equine sperm processing procedure.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Artificial insemination (AI) is becoming more and more popular in the equine industry but it is still less widespread than in other domestic animals (e.g. bovine) due to problems of sperm survival during transport and considerably

variation in ejaculate quality between stallions (Morrell et al., 2008). However, since stallions are not generally selected for reproductive efficiency but pedigree, conformation and performance record (Varner et al., 2008), there is a high interest to reproduce bad fertility horses. Most authors agreed that individual variability is the main factor that has prevented the widespread use of chilled and cryopreserved spermatozoa (Aurich, 2008; Loomis and Graham, 2008; Samper and Morris, 1998; Sieme et al., 2008). According to the capacity of their sperm to be processed stallions are classified as “Bad and Good Coolers/Freezers” (Aurich, 2008; Brinsko et al., 2000; Loomis, 2006). This variability

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3943808; fax: +34 91 3943808.
E-mail addresses: luna.gutierrez@vet.ucm.es (L. Gutiérrez-Cepeda), alvaroferman@telefonica.net (A. Fernández), fcrcas@oc.mde.es (F. Crespo), jaime.gosalvez@uam.es (J. Gosálvez), cserres@vet.ucm.es (C. Serres).

has also been reported between breeds (Alvarenga et al., 2003), and in this context the Purebred Spanish Horse (P.R.E. horse) represents a good example of low semen quality and freezing–thawing tolerance breed (Benito et al., 2003).

For many years in human assisted-reproduction procedures there have been special protocols to prepare the sperm and improve its quality (Edmond et al., 2008; Macpherson et al., 2002; Morrell et al., 2008). It has been suggested that sperm quality could be enhanced, particularly in stallions identified as “bad coolers/freezers”, by removing some of the seminal plasma by simple centrifugation (e.g. Aurich, 2008; Brinsko et al., 2000; Loomis, 2006). However, such a procedure does not select the best sperm (Johannisson et al., 2009) and colloidal centrifugation (CC) is a useful technique which has proved to enhance semen quality by selection of the best spermatozoa from the ejaculate of humans, bulls and horses (Edmond et al., 2008; Johannisson et al., 2009; Love et al., 2002; Macpherson et al., 2002; Morrell et al., 2008). The technique is recommended in assisted-reproduction procedures to improve fertility of subfertile stallions (Brinsko, 2006; Edmond et al., 2008; Geraghty, 2006; Loomis and Graham, 2008; Macpherson et al., 2002; Varner et al., 2008) and could help to expand the use of artificial breeding techniques in horses.

The main problem is that current equine CC protocols use a very low centrifugation volume (2–5 ml extended semen, 1:1) and a high quantity of centrifugation product. Considering that the normal ejaculate volume ranges between 40 and 150 ml, we will have to expect to use between 16 and 60 centrifuge tubes (50 ml) and 160–600 ml of centrifugation product, what is clinically not viable due to the cost and technical difficulties inherent to the process.

The aim of this study was to investigate and determine the optimal processing procedures necessary to adapt the use of a CC product in the equine reproduction industry. We examined the effect of gradient volume and number of layers on recovery rate and heading sperm quality in terms of sperm motility and morphology, vitality and chromatin integrity in sperm pellets after centrifugation.

2. Material and methods

2.1. Animals

Semen (two ejaculates per stallion) was obtained between October and December 2009 from ten Purebred Spanish Horses (P.R.E. horses), located at the Depósito de Sementales de Ávila (FESCCR), (40,66:N 4,70:W) in Spain.

Stallions ranged in aged from 7 to 15 years, were clinically healthy and with documented fertility. All animals were kept under controlled feeding and housing conditions.

2.2. Semen collection

Semen was collected on a regular basis (two collections/week) by allowing the stallions to mount a phantom and ejaculate into a Missouri-model artificial vagina (Nasco, Fort Atkinson, WI), lubricated with a sterile non-spermicidal gel (IMV technologies, L'Aigle, France) and warmed to 45–50 °C prior to the semen collection. The semen was collected into a warm plastic bottle fitted with a filter to capture gel.

A total of 19 ejaculates were used.

2.3. Semen processing

We used a split-ejaculate test-centrifugation procedure to evaluate the six colloidal centrifugation protocols on the basis of sperm quality, cost and technical characteristics. The collected, gel-free ejaculate was immediately transported to the laboratory for evaluation and processing. An aliquot of 1 ml was separated to obtain the initial (control) sperm values considered. Thereafter, semen was distributed into the different centrifugation protocols as described in Table 1 and resulting sperm pellets were evaluated for sperm quality, and sperm recovery rate.

2.4. Colloidal centrifugation

Aliquots of stallion ejaculates were prepared on a density gradient as described previously. Density-gradient centrifugation with EquiPure™ (Nidacon, International AB, Mölndal, Sweden) briefly, was prepared by pipetting the volume of the higher density layer (Bottom layer) into a 50-ml centrifuge tube and carefully layering, if required, the volume of the lower density layer on top (Top layer); an aliquot of semen, raw or extended (INRA96® [IMV technologies, L'Aigle, France] 1:1, v:v) according to protocol (Table 1), was pipetted on top of the upper layer. Loaded tubes were centrifuged at 300g × 20 min and after that the supernatant and most of the gradient material was removed by aspiration and the resulting sperm pellets were evaluated for sperm quality and sperm recovery rate.

2.5. Sperm concentration and motility

Spermatozoa concentration and motion characteristics were evaluated using a computer-assisted sperm motion analyzer microscope (Sperm Class Analyzer®, Microptic

Table 1
Description of the different colloidal centrifugation protocols.

Colloidal centrifugation protocols	Bottom layer	Top layer	Raw semen	Diluted semen
1	5 ml	5 ml	–	5 ml
2	10 ml	10 ml	–	10 ml
3	10 ml	–	–	10 ml
4	5 ml	5 ml	5 ml	–
5	10 ml	10 ml	10 ml	–
6	10 ml	–	10 ml	–

SL, Barcelona, Spain) equipped with a heated stage and phase contrast optics (20× objective, Optiphot-2, Nikon, Japan). Warmed (37 °C) analysis chambers (fixed height of 20 µm) affixed to microscope slides (Leja Standard Count 2 chamber slides; Leja Products, B. V., Nieuw-Vennep, The Netherlands) were loaded with 2 µl volume of extended semen (25 µl of each sample extended in 1 ml of INRA96®) and insert into the CASA instrument for evaluation.

The major settings used for CASA were as follows: STR threshold for progressive motility, 60%; LIN threshold for circular spermatozoa, 50%; 32 frames per sequence; minimum of 15 frames per object; minimum area for objects 25 pix and 10 mm/s as velocity limit for immobile objects. A minimum of 500 spermatozoa were analyzed per sample.

Experimental endpoints included: percentage of motile sperm (MOT); percentage of progressively motile sperm (PMOT); straightness (%; STR); beat cross-frequency (Hz; BCF); amplitude of lateral displacement (µm; ALH) and linearity (%; LIN).

2.6. Spermatic chromatin integrity

The degree of DNA damage in each sample was quantified using the sperm DNA fragmentation index (sDFI—% ratio of fragmented cells) as assessed using the Sperm-Halomax™ kit (ChromaCell SL, Madrid, Spain). This methodology is based on the sperm chromatin dispersion (SCD) test, described for horses by López-Fernández et al. (2007).

For each sample, 25 ml of diluted spermatozoa ($10 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) was added to a vial containing low melting point agarose and gently mixed. A small aliquot of the agarose–sperm mixture (10 ml) was then spread upon pre-treated slides (provided in the Halomax™ kit), covered with a glass coverslip and placed in a refrigerator on a cold metallic plate for 5 min. Following solidification, the coverslip was carefully removed and the ‘sperm-gel’ slide preparation placed horizontally in 10 ml of the lysing solution provided in the Halomax™ kit for 5 min. The ‘sperm-gel’ preparation was subsequently washed in dH₂O for 5 min and then dehydrated in a series of ethanol baths (70%, 90% and 100%).

Table 2
Means values in motility variables [$p < 0.05$].

Treatment	PMMNS	MOT	PMOT	N	LIN	STR	ALH	BCF	VIT	sDFI
Control	308012.74 ^a	71.00 ^a	43.09 ^a	46.33 ^a	55.20^b	72.38^b	3.20 ^a	9.42 ^a	77.88 ^a	12.48 ^a
1	411185.05 ^a	71.09 ^a	46.99 ^a	49.16 ^a	63.18^a	80.28^a	2.84 ^a	10.43 ^a	75.94 ^a	12.92 ^a
2	362111.73 ^a	65.00 ^a	44.17 ^a	51.42 ^a	62.01^a	82.30^a	2.89 ^a	11.06 ^a	76.94 ^a	11.23 ^a
3	349745.12 ^a	67.28 ^a	46.22 ^a	49.37 ^a	62.69^a	83.32^a	2.80 ^a	11.13 ^a	78.78 ^a	12.91 ^a
4	362734.46 ^a	66.67 ^a	43.28 ^a	50.94 ^a	59.47^{a,b}	79.43^a	2.96 ^a	10.67 ^a	75.94 ^a	10.76 ^a
5	328912.68 ^a	67.39 ^a	41.32 ^a	51.00 ^a	60.44^{a,b}	80.69^a	2.92 ^a	10.72 ^a	79.22 ^a	10.54 ^a
6	379007.91 ^a	64.42 ^a	42.72 ^a	50.11 ^a	60.29^{a,b}	80.57^a	2.94 ^a	10.75 ^a	74.89 ^a	12.12 ^a

Means values of total number of progressively motile and morphologically normal sperm (PMMNS [$\times 10^9$]); percentage of morphologic normal sperm (N [%]); percentage of total motile sperm (MOT [%]); percentage of progressively motile sperm, (PMOT [%]); linearity (LIN [%]); straightness (STR [%]); amplitude of lateral head displacement (ALH [µm]); beat cross-frequency (BCF [Hz]); vitality (VIT [%]); DNA fragmentation index (sDFI [%]). Treatment 1 (5 ml bottom layer, 5 ml top layer and 5 ml diluted semen); Treatment 2 (10 ml bottom layer, 10 ml top layer and 10 ml diluted semen); Treatment 3 (10 ml bottom layer and 10 ml diluted semen); Treatment 4 (5 ml bottom layer, 5 ml top layer and 5 ml raw semen); Treatment 5 (10 ml bottom layer, 10 ml top layer and 10 ml raw semen); Treatment 6 (10 ml bottom layer and 10 ml raw semen).

Significant different variables ($p < 0.05$) are shown in bold.

Superscript letters represent significant differences between treatments ($p < 0.05$) in each variable.

For direct visualization of DNA damage, fluorescent microscopy was conducted using SyberGreen II fluoro-chrome at 40× concentration. Sperm heads, which display a large halo of chromatin dispersion, correspond to those containing highly fragmented DNA. The percentage of spermatozoa with fragmented DNA was then calculated and indexed against the total sperm counted (200 spermatozoa per sample).

2.7. Sperm morphology and vitality

Sperm morphology was subjectively determined by evaluating 100 cells preserved in buffered formalin (Varner, 2008).

Sperm vitality was determined mixing an aliquot of sperm with eosin–nigrosin on a slide for vitality evaluation (Kenney, 1983).

2.8. Statistical analysis

The sperm yields obtained from each density gradient and single layer were calculated by expressing the number of spermatozoa obtained as a percentage of the initial load.

In order to stop individual differences we evaluated the increase of post-treatment (VT) respect control (VC) values, (VT – VC).

Samples (two replicates per stallions) were statistically evaluated by ANOVA and Duncan tests ($p < 0.05$) for sperm quality parameters considered and recovery rate. Data were processed using the SPSS-17 statistical package.

3. Results

When comparing the media values of the variables (Table 2) we found that STR was significant higher in treated-samples comparing to control and that significant differences were shown in LIN in treatments 1, 2 and 3 comparing to control, but with no significance respect 4, 5 and 6 or between CC protocols. No significant differences among the other variables analyzed were found between unselected (control) and selected samples.

Table 3 shows the values of the increase of post-treatment (VT) respect control (VC) values, (VT – VC). There

Table 3Increase of the post-treatment value respect the control value in motility variables [$p < 0.05$].

Treatment	dPMMS	dMOT	dPMOT	dN	dLIN	dSTR	dBFC	dALH	dVIT	dsDFI
Control	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00^b	0.00^b	0.00^b	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^{a,b}
1	119281.69 ^a	1.21 ^a	5.04 ^a	2.95 ^a	8.99^a	9.79^a	1.19^a	-0.38 ^a	-0.11 ^a	0.22 ^b
2	70208.38 ^a	5.62 ^a	2.22 ^a	5.58 ^a	7.87^a	10.99^a	1.82^a	-0.33 ^a	-0.16 ^a	-1.47 ^{a,b}
3	57841.76 ^a	3.89 ^a	4.27 ^a	2.74 ^a	8.27^a	11.20^a	1.89^a	-0.43 ^a	1.58 ^a	0.21 ^b
4	45268.74 ^a	4.47 ^a	-1.03 ^a	1.78 ^a	4.49^{a,b}	7.08^a	1.40^a	-0.32 ^a	-0.28 ^a	-1.87 ^{a,b}
5	11446.96 ^a	5.52 ^a	-3.00 ^a	1.44 ^a	5.41^{a,b}	9.21^a	1.45^a	-0.36 ^a	-0.00 ^a	-2.09 ^a
6	61542.19 ^a	7.94 ^a	-1.59 ^a	1.39 ^a	5.56^{a,b}	9.94^a	1.49^a	-0.34 ^a	-4.33 ^a	-0.51 ^{a,b}

Increase of the post-treatment value (VT) respect the control value (VC), $(VT - VC) = d$. dPMMS ($\times 10^9$); dMOT (%); dPMOT (%); dN (%); dLIN (%); dSTR(%); dALH (μm); dBFC (Hz); dVIT (%); dsDFI (%). Treatment 1 (5 ml bottom layer, 5 ml top layer and 5 ml diluted semen); Treatment 2 (10 ml bottom layer, 10 ml top layer and 10 ml diluted semen); Treatment 3 (10 ml bottom layer and 10 ml diluted semen); Treatment 4 (5 ml bottom layer, 5 ml top layer and 5 ml raw semen); Treatment 5 (10 ml bottom layer, 10 ml top layer and 10 ml raw semen); Treatment 6 (10 ml bottom layer and 10 ml raw semen).

Significant different variables ($p < 0.05$) are shown in bold.

Superscript letters represent significant differences between treatments ($p < 0.05$) in each variable.

were significant higher values of STR and BCF in selected compared to control samples. LIN showed higher values in extended semen protocols (1, 2 and 3) compared to control. No significant differences were found in the other variables between control and CC protocols.

When evaluating each horse individually we found a general increase in the number of progressively motile and morphologically normal sperm, LIN, STR and sDFI in at least one of the protocols evaluated compared to control. The proportion of morphologically normal spermatozoa was increased in horse Aa from 75% before centrifugation to 90% [in protocol 6] or 88% [4, 5] (all types of abnormalities decreased in general in this case) and from 17% to 33% [2], 30% [1] or 28% [4] in horse Ac (where intermediate piece abnormalities were mainly decreased). PMOT was strongly improved (over 50% or 60%) as shown in horses Ab (40.69 vs. 66.89 [2], 66.48 [6] and 65.34 [4]), Ad (36.3 vs. 56.2 [3], and 48.37 [1]) and Bh (46 vs. 62.5 [1] and 58.05 [4]).

4. Discussion

This study generally obtained higher LIN, STR and BCF values by colloidal centrifugation compared to control. These variables have been described as measure of progressivity (LIN, STR) and spermatozoa vigor (BCF) (Cancel et al., 2000). As a direct correlation between sperm chromatin integrity and fertility has been reported (López-Fernández et al., 2007; Love and Kenney, 1994; Morrell et al., 2009a), and spermatid chromatin integrity trended to be higher (as shown by lower values of sDFI) in protocols 2, 4, 5 and 6, an improvement in sperm quality could be obtained. These results agree with others reported by several authors so that colloidal centrifugation seem to be a useful technique to maximize stallion fertility (Brinsko, 2006; Edmond et al., 2008; Geraghty, 2006; Johannisson et al., 2009; Loomis, 2006; Macpherson et al., 2002; Morrell et al., 2008, 2009a, 2009b; Varner et al., 2008). Consistent results from various studies indicate that this is an effective method in selecting highly motile spermatozoa, and spermatozoa with normal morphology and intact chromatin (Johannisson et al., 2009) and discriminate bacteria, inflammatory cells and death spermatozoa that may be responsible for some of the spermatozoa sublethal damage and serve as a source of reactive oxygen species (ROS) what are considered to be detrimental to sperm quality and survival (Ortega-Ferrusola et al.,

2009; Johannisson et al., 2009). So this technique may determinate a sanitary and quality sperm improvement (Johannisson et al., 2009; Ortega-Ferrusola et al., 2009).

Stallions represent 50% of the breeding process and the horse industry is replete with stallions whose level of fertility is undesirable (Varner et al., 2008). The main reason for this situation is that stallions are selected on the basis of pedigree, conformation and performance record (Varner et al., 2008) rather than reproductive efficiency. This is not seen with production animals because males for semen production in these species can be selected for semen quality and sperm viability. (López-Fernández et al., 2007; Morrell et al., 2008). Some forms of sub-fertility may have a genetic basis but subfertility is also associated with situations (such as aging, training programs, management, environmental factors, medications (such as progestogens, anabolic steroids, NSAIDs. . .), fever, systemic diseases, genital trauma. . .) in which an inadequate reproductive function causes low sperm quality in an otherwise fertile stallion (Varner et al., 2008). Our aim as veterinarians is to deal with these scenarios in order to improve the sperm quality and fertility of the horses we work with.

When evaluating each horse individually we found an individual response to the different treatments what reflects the characteristic individual sperm-response variability among horse population (Aurich, 2008; Loomis and Graham, 2008; Samper and Morris, 1998; Sieme et al., 2008). However, a positive general effect in sperm quality was shown with CC methods.

Variability found for all data could be due to spermatid concentration differences between ejaculates. Future studies could try to adapt these protocols according to sperm concentration.

Current colloidal centrifugation protocols (as the ones described for EquiPure™) are clinically complicated in the equine sperm processing technique due to economic and technical difficulties. The possibility of using a single layer method, which avoids the necessity of layering a density gradient, or/and a higher centrifugation volume, are attractive for stud personnel because of the time and cost-saving element and simplification of the protocol (Morrell et al., 2008). We found that the use of a single layer method and/or a higher centrifugation volume did not decrease sperm quality compared to the EquiPure™ commercial

protocol [1]. Moreover, we improved PMOT by 50–60% which may allow low quality ejaculate stallions into refrigeration/cryopreservation artificial insemination programs helping to widespread the use of artificial breeding techniques in stallion population.

According to these results it seems to be possible to incorporate single layer and or high colloidal centrifugation volume protocols what would make them simple, economic and clinically workable for the equine sperm processing procedure.

5. Conclusion

Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated to the clinical equine sperm processing procedure. According our findings, single layer methods and high either extended or pure sperm volume protocols may be appropriated EquiPure™ procedures for equine sperm.

Acknowledgements and additional information

Authors are indebted to the FESCCR for supporting and greatly facilitating our work. This study was supported by Equipos Veterinarios-Biológicos, S.L. Gutiérrez-Cepeda, L. was supported by MICINN FPU fellowship AP2008-02034.

References

- Alvarenga, M.A., Leao, K.M., Papa, F.O., Landim-Alvarenga, F.C., Medeiros, A.S.L., Gomes, G.M., 2003. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: *Proceedings, Workshop on Transporting Gametes and Embryos*, Havemeyer Foundation, pp. 74–76.
- Aurich, C., 2008. Recent advances in cooled-semen technology. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 268–275.
- Benito, D., Alvarez, A., Crespo, F., Mateos, E., Gómez-Cuétara, C., Serres, C., 2003. Análisis computerizado del semen de caballo de Pura Raza Española. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Las Palmas, España.
- Brinsko, S.P., 2006. Insemination doses: how low can we go? *Theriogenology* 66, 543–550.
- Brinsko, S.P., Crockett, E.C., Squires, E.L., 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 54, 129–136.
- Cancel, A.M., Lobdell, D., Mendola, P., Perreault, D., 2000. Objective evaluation using assisted reproductive tesperm analysis. *Hum. Reprod.* 15, 1322–1328.
- Edmond, A.J., Teague, S.R., Brinsko, S.P., Comerford, K.L., Waite, J.A., Mancill, S.S., Love, C.C., Varner, D.D., 2008. Effect of density-gradient centrifugation on quality and recovery rate of equine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 318.
- Geraghty, R.M., 2006. Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen. *Equine Vet. J.* 38, 224–229.
- Johannisson, A., Morrell, J.M., Thorén, J., Jönsson, M., Dalin, A.-M., Rodríguez-Martínez, H., 2009. Colloidal centrifugation with Androcoll-ETM prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Anim. Reprod. Sci.* 116, 119–128.
- Kenney, R.M., 1983. *Manual for clinical fertility evaluation of the stallion*, Society for Theriogenology. Hastings, NE.
- Loomis, P.R., 2006. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. N. Am.: Equine* 22, 663–676.
- Loomis, P.R., Graham, J.K., 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim. Reprod. Sci.* 105, 119–128.
- López-Fernández, C., Crespo, F., Arroyo, F., Fernández, J.L., Arana, P., Johnston, S.D., Gosálvez, J., 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* 68, 1240–1250.
- Love, C.C., Kenney, R.M., 1994. Relationship of sperm chromatin to fertility in the stallion. In: *Proceedings of the 40th Annual Convention AAEP*, pp. 21–22.
- Love, C.C., Brinsko, S.P., Varner, D.D., 2002. Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallion. *Theriogenology* 58, 317–320.
- Macpherson, M.L., Blanchard, T.L., Love, C.C., Brinsko, S.P., Varner, D.D., 2002. Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallion. *Theriogenology* 58, 317–320.
- Morrell, J.M., Dalin, A.-M., Rodríguez-Martínez, H., 2008. Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. *Anim. Reprod.* 5, 121–126.
- Morrell, J.M., Johannisson, H., Strutz, H., Dalin, A.-M., Rodríguez-Martínez, H., 2009a. Colloidal centrifugation of stallion semen: changes in sperm motility, velocity, and chromatin integrity during storage. *J. Equine Vet. Sci.* 29, 24–32.
- Morrell, J.M., Thorén, J., Jönsson, M., Dalin, A.-M., Rodríguez-Martínez, H., 2009b. Colloidal centrifugation with Androcoll-ETM prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Anim. Reprod. Sci.* 116, 119–128.
- Ortega-Ferrusola, C., González-Fernández, L., Muriel, A., Macías-García, B., Rodríguez-Martínez, H., Tapia, J.A., Peña, F.J., 2009. Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezeability of stallion sperm? *Reprod. Domest. Anim.* 44, 518–522.
- Samper, J.C., Morris, C.A., 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 49, 895–903.
- Sieme, H., Harrison, R.A.P., Petrunkina, A.M., 2008. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 276–292.
- Varner, D.D., 2008. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70, 448–462.
- Varner, D.D., Love, C.C., Brinsko, S.P., Blanchard, T.L., Bliss, S., Carroll, S., Eslick, M., 2008. Semen processing for the subfertile stallion. *J. Equine Vet. Sci.* 28, 677–685.

CAPÍTULO 5: ARTÍCULO 2



**Reproduction
in Domestic Animals**

Short Communication

Colloidal Centrifugation of Stallion Semen Results in a Reduced Rate of Sperm DNA Fragmentation

F Crespo¹, L Gutiérrez-Cepeda², J Gosálvez³, C Serres² and SD Johnston⁴

¹Department of Reproduction, Centro Militar de Cría Caballar, (FESCCR-Ministry of Defense), Ávila, Spain; ²Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, UCM, Madrid, Spain; ³Department of Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; ⁴School of Agriculture and Food Science, University of Queensland, Gatton, Qld, Australia

Contents

Stallion spermatozoa recovered and examined immediately after colloidal centrifugation resulted in a higher straight-line velocity (VSL) than sperm processed using direct conventional centrifugation ($p = 0.000$), but there was no differences in the progressive motility or sperm DNA fragmentation (SDF) as determined by the sperm chromatin dispersion assay. However, when centrifuged spermatozoa were incubated at 37°C for 24 h to determine the rate of SDF (r-SDF), a lower r-SDF ($p = 0.0011$) was observed in those sperm recovered after colloidal separation ($0.5 \pm 0.1\%/h$) compared to direct ($1.2 \pm 0.4\%/h$) or no centrifugation ($r-SDF = 1.2 \pm 0.3\%/h$). These results confirm that colloidal separation of stallion spermatozoa results in prolonged sperm DNA longevity, but these differences were only apparent following a period of incubation and dynamic assessment. Consequently, we strongly recommend the use of the dynamic form of the SDF assay for evaluating centrifugation and/or other *ex vivo* procedures, as a single basal assessment of SDF may inadvertently result in a false-positive evaluation of DNA quality.

Introduction

The assessment of sperm chromatin as a predictor of male fertility is now well established in human medicine and animal artificial breeding industries (Agarwal and Allamaneni 2004; Zini and Libman 2006; Bungum et al. 2011). More recently, our group has been advocating the use of a dynamic form of sperm chromatin quality assessment in which the spermatozoa are incubated in a physiological environment simulating the best conditions for *ex vivo* sperm maintenance and which can account for the latent expression of chromatin damage that is not typically detected immediately after ejaculation, cryopreservation or semen processing (Gosálvez et al. 2011a,b). Consequently, the sperm DNA fragmentation (SDF) dynamic assay represents a sensitive tool for revealing the effects of iatrogenic damage on the DNA molecule, a phenomenon that is also highly variable because of the differences in genetic design of sperm DNA of different species (Gosálvez et al. 2011b).

Using the terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay, Hoo-

gewijs et al. (2010) revealed no difference in sperm DNA quality following different strength conventional centrifugation protocols compared to uncentrifuged stallion spermatozoa but did note a reduction in DNA intact sperm cells after 72-h chilled storage. Colloidal centrifugation has been used successfully to enhance stallion semen quality (Macpherson et al. 2002, 2002; Edmond et al. 2008; Morrell et al. 2008; Johannisson et al. 2009; Gutierrez-Cepeda et al. 2011), but its specific effect on sperm DNA integrity following storage of spermatozoa was only examined by Johannisson et al. (2009) using the sperm chromatin structure assay and Gutierrez-Cepeda et al. (2011) using sperm chromatin dispersion (SCD); both these studies revealed that colloidal centrifugation selects spermatozoa with intact DNA, but Johannisson et al. (2009) also noted that centrifuged spermatozoa showed no loss of DNA integrity following chilled storage compared to non-centrifuged spermatozoa.

In the current study, we explored the sensitivity of the dynamic SCD technique following incubation of spermatozoa at 37°C for 24 h to compare the efficacy of direct and colloidal centrifugation of stallion sperm prior to its use in artificial insemination; we were interested in documenting the dynamic response of chromatin stability under conditions that might stimulate the spermatozoon within the mare's reproductive tract once the semen had been processed.

Material and Methods

Seventeen ejaculates from six different pure Spanish breed stallions (2–3 ejaculates per horse) were used in the study. Each ejaculate was initially diluted 1 : 1 (v:v) in INRA96 (IMV Technologies, L'Aigle, France) and processed using three different centrifugation procedures: (i) no centrifugation (NC), (ii) direct centrifugation (DC), whereby the diluted semen was centrifuged at room temperature for 7 min at 700g and (iii) centrifugation using a single colloidal layer according to the specifications of EquiPure (Nidacon, International AB, MoÅN Indal, Sweden) that was spun at 350g for 20 min (CC). Immediately following centrifugation (T0), an aliquot of semen from the pellet of the direct centrifuged semen and the colloidal centrifuged semen was assessed for sperm quality as was the NC sample.

Correction added on May 22 2013, after first online publication: The order and affiliations of the authors have been corrected.

The percentage of forward progressive motility (%PM) and the straight-line velocity (VSL) of sperm movement were determined for each sample using a computerized analysis system (SCA) (Microptic, Barcelona, Spain). Sperm DNA Fragmentation was assessed using the HALOMAX Kit (Halotech SL, Madrid, Spain). The use of this assay and the dynamic form of the assay for stallion semen has been validated and reported in Lopez-Fernandez et al. (2007). To reveal the possible existence of cryptic DNA damage not initially detectable at T0, a dynamic approach to the determination of SDF was also conducted by incubating aliquots of the original diluted sample, direct centrifuged and colloidal centrifuged pellets at 37°C over 24 h. The rate of SDF (r-SDF) was calculated as the increasing loss of DNA quality during a predefined incubation time of 24 h; consequently, SDF was assessed at T0 (baseline), T4, T6 and T24 h.

Statistical analysis was performed using the StatsPLus® (STATPLUSMAC, Version 2009, AnalystSoft; <http://www.analystsoft.com/en/>). All percentage data were arcsine-transformed prior to analysis. A one-way repeated measures ANOVA was used to analyse the percentage progressive motility, SLV and SDF at T0 data immediately after centrifugation as well as the rate of SDF over a 24-h period; *post hoc* Bonferroni tests for the difference between means were used to compare treatments. The rate of SDF was calculated from the slope of the linear regression equation determined from each semen sample.

Results

Table 1 shows the effect of centrifugation (none, direct and colloidal) on the percentage of progressively motile sperm, VSL and SDF following centrifugation when assessed immediately after sample recovery (SDF-T0). There was no difference in the progressive motility or SDF at T0 between non-centrifuged, direct and colloidal centrifuged stallion spermatozoa. While the VSL of both direct and colloidal centrifuged spermatozoa were not significantly different following centrifugation, both were lower and significantly different ($p < 0.001$) than those in non-centrifuged spermatozoa.

Figure 1 illustrates the SDF dynamics of the non-centrifuged, direct and colloidal centrifuged stallion spermatozoa over a 24-h period of incubation at 37°C; the r-SDF is presented in Table 1. The r-SDF over 24 h of incubation was lower ($p < 0.01$) following colloidal centrifugation than that following non-centrifuged and direct centrifuged spermatozoa, but there was no difference in the r-SDF between non-centrifuged and direct centrifuged spermatozoa.

Discussion

When examined immediately after either direct or colloidal centrifugation (T0), there was no difference in the proportion of stallion spermatozoa with progressive motility or damaged DNA. This finding is inconsistent with an improvement in stallion SDF following colloidal centrifugation noted by Edmond (2009) and Gutierrez-Cepeda et al. (2011) and with a decrease in

Table 1. Effect of centrifugation on percentage progressive motility, VSL, sperm DNA fragmentation (SDF) immediately after centrifugation and the rate of SDF following incubation of sperm for 24 h at 37°C

Treatment	Percentage progressive motility	VSL ($\mu\text{m/s}$)	SDF T0	SDF rate (%/h)
No centrifugation	56.6 \pm 3.0 ^a	55.8 \pm 2.4 ^a	14.2 \pm 2.2 ^a	1.2 \pm 0.3 ^a
Direct centrifugation	55.8 \pm 2.3 ^a	43.7 \pm 1.8 ^b	14.1 \pm 1.8 ^a	1.2 \pm 0.4 ^a
Colloidal centrifugation	53.8 \pm 3.7 ^a	46.2 \pm 1.9 ^b	10.7 \pm 1.7 ^a	0.5 \pm 0.1 ^b

Different superscripts indicate a significant difference in means within columns.

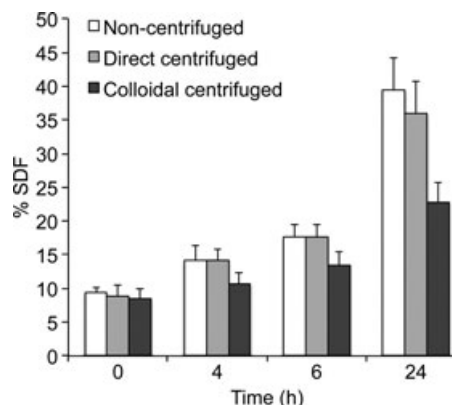


Fig. 1. Effect of centrifugation on the percentage sperm DNA fragmentation (SDF) of stallion spermatozoa incubated for 24 h at 37°C

SDF of selected vs unselected spermatozoa reported by Johannisson et al. (2009) after 3-, 24- and 48-h chilled storage. A major difference between the current study and that of Johannisson et al. (2009) was that stallion spermatozoa in our experiment were incubated at 37°C, not chilled, so that the rate of DNA degradation was greatly enhanced after 24 h. By incubating spermatozoa in physicochemical conditions approximating that of the female's reproductive tract and observing the sperm DNA dynamics, it was possible to account for that fraction of the sperm population with damaged DNA that had not been apparently removed by colloidal centrifugation, but which at T0 had not yet been expressed; such is the sensitivity of the dynamic assessment of SDF using the SCD. Using the TUNEL assay, Hoogewijs et al. (2010) have also recently reported that the DC of stallion semen had no effect on sperm chromatin damage, even after 4 days chilled storage, but we would argue based on the results of this experiment that the spermatozoa may not have been sufficiently physiologically challenged to uncover differences in DNA damage.

In conclusion, our results appear to support the use of a colloidal centrifugation technique in terms of prolonging DNA longevity, but at the same time, this strategy appears to have little influence in our hands on improving the kinetic characteristics of the semen. Dynamic assessment of SDF is clearly a more sensitive diagnostic of subtle DNA damage and represents a powerful investigative tool for the refinement of assisted

breeding technologies. We recommend the use of the dynamic form of the SDF assay for evaluating centrifugation and other *ex vivo* procedures, as a single basal assessment of SDF may inadvertently result in a false-positive evaluation of DNA quality.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education and Science, Spain (Grant BFU2010-16738/BFI).

References

- Agarwal A, Allamaneni SS, 2004: The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol* **56**, 235–245.
- Bungum M, Bungum L, Giwercman A, 2011: Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl* **13**, 69–75.
- Edmond AJ, 2009: Effect of Density Gradient Centrifugation on Quality and Recovery Rate of Equine Sperm. Masters of Science Thesis. Texas A&M University, College Station, TX.
- Edmond AJ, Teague SR, Brinsko SP, Comerford KL, Waite JA, Mancill SS, Love CC, Varner DD, 2008: Effect of density-gradient centrifugation on quality and recovery rate of equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **107**, 318.
- Gosálvez J, Ramirez MA, López-Fernández C, Crespo F, Evans KM, Kjelland ME, Moreno JF, 2011a: Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: II. Dynamic features. *Theriogenology* **75**, 206–211.
- Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, Gouraud A, Holt WV, 2011b: Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from 11 species. *Mol Reprod Dev* **78**, 951–961.
- Gutierrez-Cepeda L, Fernandez A, Crespo F, Gosálvez J, Serres C, 2011: Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. *Anim Reprod Sci* **125**, 85–89.
- Hoogewijs M, Rijsselaere T, De Vlieghe S, Vanhaesebrouck E, De Schauwer C, Govaere J, Thys M, Hoflack G, Van Soom A, de Kruif A, 2010: Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology* **74**, 118–126.
- Johannisson A, Morrell JM, Thorén J, Jönsson M, Dalin AM, Rodriguez-Martinez H, 2009: Colloidal centrifugation with Androcoll-ETM prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Anim Reprod Sci* **116**, 119–128.
- Lopez-Fernandez C, Crespo F, Arroyo F, Fernandez JL, Arana P, Johnston SD, Gosálvez J, 2007: Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* **68**, 1240–1250.
- Macpherson ML, Blanchard TL, Love CC, Brinsko SP, Varner DD, 2002: Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallion. *Theriogenology* **58**, 317–320.
- Morrell JM, Dalin AM, Rodriguez-Martinez H, 2008: Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. *Anim Reprod Sci* **5**, 121–126.
- Zini A, Libman J, 2006: Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* **175**, 495–500.

Submitted: 17 Apr 2012; Accepted: 26 May 2012

Author's address (for correspondence): SD Johnston, School of Agriculture and Food Science, University of Queensland, Gatton, Qld 4343, Australia. E-mail: s.johnston1@uq.edu.au

CAPÍTULO 6: ARTÍCULO 3



RESEARCH

Open Access

The effect of two pre-cryopreservation single layer colloidal centrifugation protocols in combination with different freezing extenders on the fragmentation dynamics of thawed equine sperm DNA

Luna Gutiérrez-Cepeda^{1*}, Álvaro Fernández¹, Francisco Crespo², Miguel Ángel Ramírez³, Jaime Gosálvez⁴ and Consuelo Serres¹

Abstract

Background: Variability among stallions in terms of semen cryopreservation quality renders it difficult to arrive at a standardized cryopreservation method. Different extenders and processing techniques (such as colloidal centrifugation) are used in order to optimize post-thaw sperm quality. Sperm chromatin integrity analysis is an effective tool for assessing such quality. The aim of the present study was to compare the effect of two single layer colloidal centrifugation protocols (prior to cryopreservation) in combination with three commercial freezing extenders on the post-thaw chromatin integrity of equine sperm samples at different post-thaw incubation (37°C) times (i.e., their DNA fragmentation dynamics).

Results: Post-thaw DNA fragmentation levels in semen samples subjected to either of the colloidal centrifugation protocols were significantly lower ($p < 0.05$) immediately after thawing and after 4 h of incubation at 37°C compared to samples that underwent standard (control) centrifugation. The use of InraFreeze[®] extender was associated with significantly less DNA fragmentation than the use of Botu-Crio[®] extender at 6 h of incubation, and than the use of either Botu-Crio[®] or Gent[®] extender at 24 h of incubation ($p < 0.05$).

Conclusions: These results suggest that single layer colloidal centrifugation performed with extended or raw semen prior to cryopreservation reduces DNA fragmentation during the first four hours after thawing. Further studies are needed to determine the influence of freezing extenders on equine sperm DNA fragmentation dynamics.

Keywords: Colloidal centrifugation, Equine sperm, DNA fragmentation, Cryopreservation, Equipure[®]

Background

The use of cryopreserved equine sperm is becoming increasingly important in breeding strategies. However, variability among stallions in terms of semen cryopreservation quality renders it difficult to arrive at a standardized cryopreservation method [1,2]. Neither are there standard methods for determining pre-cryopreservation

nor post-thaw sperm quality, nor indeed are there any standard artificial insemination protocols [3].

Traditional laboratory methods are unable to accurately determine the fertility of cryopreserved semen [4]. Spermatozoa with damaged chromatin appear normal in terms of their membrane integrity, morphology and motility, but their use would lead to post-fertilization embryo failure [5]. The need to include sperm chromatin integrity analysis in the assessment of semen has been indicated by several authors who report a direct correlation between fertility and sperm chromatin integrity

* Correspondence: luna.gutierrez@vet.ucm.es

¹Animal Medicine and Surgery Department, Veterinary Faculty, UCM, Avda. Puerta de Hierro s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

[6] but a poor correlation between fertility and the classically measured sperm quality variables [7-10]. The analysis of DNA fragmentation dynamics is important since DNA can become fragmented during this time, even within the female reproductive tract.

Certainly, López-Fernández et al. [9] and Cortés-Gutiérrez et al. [11] have shown, at least *in vitro*, that the DNA of thawed semen incubated at 37°C becomes less stable over time. Moreover, it is important the use of the dynamic form of the Sperm DNA Fragmentation (SDF) assay for evaluating centrifugation and / or other *ex vivo* procedures, as a single basal assessment of SDF may inadvertently result in a false-positive evaluation of DNA quality [6].

The wide variability among stallions in terms of how well their semen can be cryopreserved demands that test freezing be performed to determine which technique is most suitable in each case [12]. This is particularly important when dealing with “bad freezer stallions”, a significant problem among Purebred Spanish horses.

The pre-cryopreservation colloidal centrifugation of equine semen can increase the post-thaw number of sperm cells with normal morphology, as well as improve sperm motility (and sperm motility characteristics), membrane integrity and viability [6,13-18]. Certainly, colloidal centrifugation selects spermatozoa with intact and mature chromatin, which have a higher density than immature or damaged sperm [19-21]; further, the removal of damaged or dead spermatozoa and leukocytes may help maintain sperm chromatin integrity by preventing future damage caused by reactive oxygen species (ROS) [10,19,20]. The advantages of such centrifugation become more evident when semen is preserved cooled or in a state of cryopreservation [20]. Colloidal centrifugation can also eliminate pathogens from semen [22-26].

Although the use of colloidal centrifugation has been correlated with lower sperm DNA fragmentation levels in fresh, cooled [10,19,20,25,27] and cryopreserved semen (with centrifugation performed before or after the cryopreservation step) [17,28,29], few studies have examined the dynamics of DNA fragmentation. To our knowledge this is the first study that combines the effect of colloidal centrifugation prior to cryopreservation and equine freezing extenders on the dynamics of DNA fragmentation over the post-thaw time.

The aim of the present study was to compare the effect of two single layer colloidal centrifugation protocols (prior to cryopreservation), developed at our laboratory [21] in combination with three commercial freezing extenders on the post-thaw chromatin integrity of equine sperm samples at different post-thaw incubation (37°C) times (i.e., the fragmentation dynamics of the sperm DNA).

Methods

Animals

Seventeen ejaculates (2–3 per stallion) were obtained between January and March 2010 from six Purebred Spanish horses at the *Depósito de Sementales de Ávila* (FESCCR) (40.66°N 4.70°W), Spain. The donor stallions, all between 7 and 15 years of age, were clinically healthy and of documented fertility. The diets and housing of these horses were those deemed to keep them in optimum condition.

Semen collection and pre-cryopreservation analysis

Semen was collected by allowing the stallions to mount a phantom, using a Missouri-model artificial vagina (Nasco, Fort Atkinson, WI, USA) warmed to 45-50°C and lubricated with a sterile non-spermicidal gel (IMV Technologies, L'Aigle, France). A mare in oestrous was used to induce sexual activity. After stabilization of the extragonadal sperm reserves (daily collection) semen was collected on a regular basis (two collections/week).

The gel-free ejaculates (maintained at 37°C) were evaluated for volume using a graduated test tube, sperm motility and concentration using a computerized analysis system running ISAS[®] software [PROYSER, Madrid, Spain].

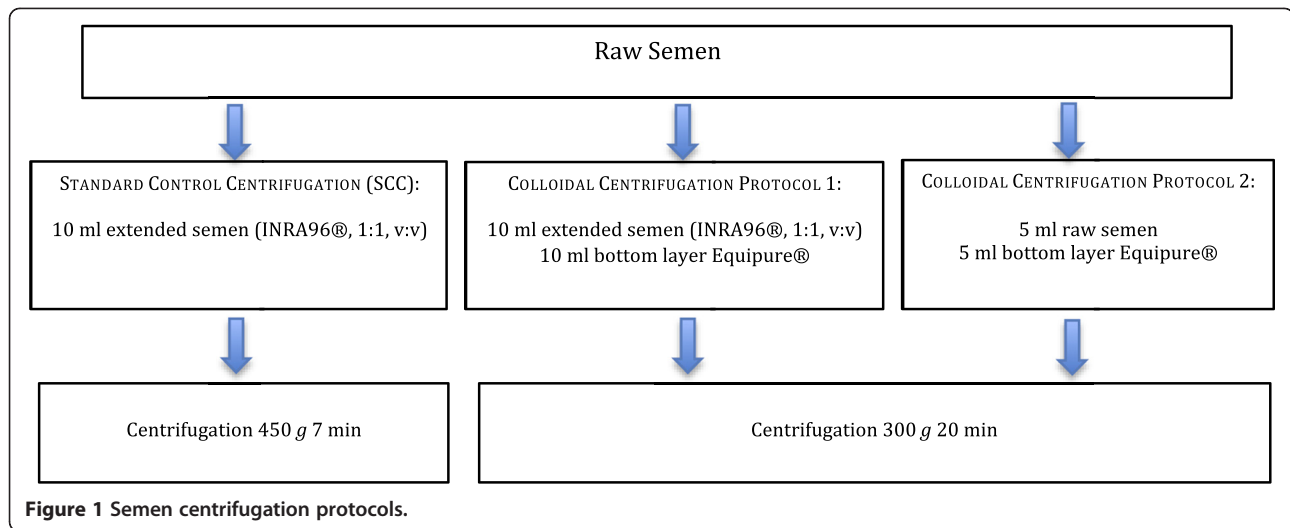
Semen centrifugation

Samples of all ejaculates were subjected to each of the following treatments (Figure 1).

- *Standard control centrifugation (SCC)*: 10 ml of semen extended 1:1 v:v with Inra96[®] (IMV technologies, L'Aigle, France) were placed in a 50 ml Falcon tube and centrifuged at 450 g for 7 min.
- *Colloidal centrifugation Protocol 1*: 10 ml of semen extended 1:1 v:v with Inra96[®] were placed on top of a 10 ml layer of Bottom Layer[®] EquiPure[®] [Nidacon, International AB, Mölndal, Sweden] equilibrated at 22°C in a 50 ml Falcon tube. Care was taken to avoid mixing the sperm and colloid phases. The loaded tubes were centrifuged at 300 g for 20 min.
- *Colloidal centrifugation Protocol 2*: 5 ml of raw semen (i.e., without extender) were placed over 5 ml of Bottom Layer[®] EquiPure[®] following the same instructions as in Protocol 1.
- After centrifugation, the supernatant (semen extender, seminal plasma and colloid) was removed by aspiration. The resulting sperm pellets were resuspended for cryopreservation in the presence of different extenders.

Cryopreservation with different extenders

The required volume of each pellet was taken to obtain a final sperm concentration of $50 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ in 5 ml



of each of three commercial freezing extenders: Gent[®] (Minitüb[®], Abfullund Labortechnik GmbH & Co., Tiefenbach, Germany), InraFreeze[®] (IMV technologies, L'Aigle, France) and Botu-Crio[®] (BioTech, Botucatu, Sao Paulo, Brazil) (total number of treatments therefore = 9; see Figure 2). After resuspension, the semen was packed into 0.5 ml polyvinyl chloride straws (IMV International, St Paul, MN, USA). The straws containing sperm extended with Gent[®] (G) extender were frozen without prior cooling [30,31]. Those containing sperm extended with InraFreeze[®] (I) were frozen after being slowly cooled to 4°C at a rate of 0.3°C/min, as recommended by the manufacturer. Finally, those containing sperm extended

with Botu-Crio[®] (B) were frozen after being cooled at 4-6°C for 20 min, as recommended by the manufacturer. In all cases the straws were frozen horizontally in racks placed 4 cm above the surface of liquid nitrogen for 7 min, after which they were plunged into this liquid nitrogen as described by Cochran et al. [30].

Assessment of post-thaw sperm chromatin integrity

After 4 weeks of storage the straws were thawed by immersion in a water bath at 37°C for 1 min. Sperm chromatin integrity was assessed via the sperm chromatin dispersion test [9] making use of the Equus-Halomax[®] Kit (Halotech DNA, SL., Madrid, Spain). The degree of

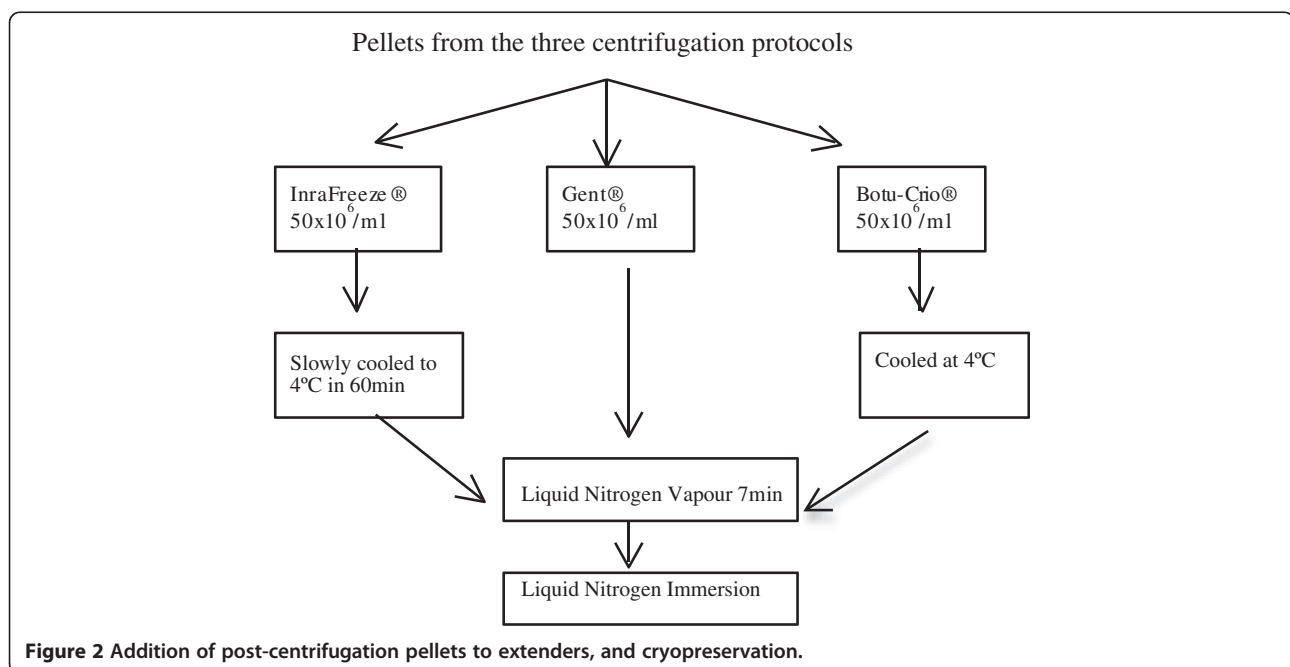


Table 1 sDFI value groups (means±SD)

STALLION	Sperm DNA fragmentation index (sDFI)	
	Low average levels	High average levels
B	15.8135 ^b ±8,88	
C	18.3176 ^b ±9,34	
F	19.4167 ^b ±13,95	
A	20.2345 ^b ±12,73	
D		27.1280 ^a ±13,20
E		30.9288 ^a ±14,97

Letters A-F represent the different stallions. Letters in superscript represent significant differences in average sDFI values (p<0.05), revealing two groups of stallions.

DNA damage in each sample was quantified using the sperm DNA fragmentation index (sDFI), which reflects the percentage of cells with fragmented DNA.

An aliquot of sperm from each straw was diluted to $10 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ and processed following the kit instructions. DNA damage was visualized using a Proyser fluorescent microscope (Proyser, Madrid, Spain) employing SyberGreen II fluorochrome at 40× concentration. Sperm heads showing a large halo of chromatin dispersion were understood to contain highly fragmented DNA. The percentage of spermatozoa with such fragmented DNA was calculated and expressed as a percentage of the total sperm count. Observations were made at 0, 4, 6 and 24 h of incubation in a 37°C water bath.

Statistical analysis

ANOVA and DUNCAN test were used to compare sDFI values. Repeat measures analysis (with Greenhouse correction) was performed to follow the change in sDFI over incubation time (within-subjects factor), considering the variable 'donor' as a source of variation (between-subjects factor). The influence of the interaction *incubation time* × *donor* on sDFI was also examined.

Significance was set at p<0.05. Data were processed using the IBM® SPSS-19® statistical package.

Results

Media sperm concentration value in fresh semen was $273,35 \times 10^6$ spermatozoa/ml (range between 189,9 and 361×10^6 spermatozoa/ml). After centrifugation, the average sperm concentration of the colloidal-centrifuged pellets (Protocols 1 and 2) was approximately half that of the SCC pellets (544.5 million sperm/ml and a 57.79% sperm yield vs. 928 million sperm/ml and a 98.5% sperm yield).

Significant differences were seen between stallion donors in terms of mean sDFI (p<0.05). Two groups with significantly different mean sDFI values were established: low (<20.23%) and high (>27.13%) (Table 1).

The sDFI values increased over incubation time for each ejaculate in all nine treatments (Table 2). However, this increase was different in different donors, with the interaction *incubation time* × *donor* having a significant effect on the sDFI value (p<0.05) (Figure 3).

A comparison of the sDFI values at different incubation times between the nine treatments (Table 2) showed no significant difference between them at 0 and 6 h. However, at 4 h of incubation Protocol 2 was associated with a trend towards lower sDFI values (less DNA fragmentation); indeed significant differences (p<0.05) were detected between the I-2 treatment and the B-C treatment (sDFI 14.22 and 22.16 respectively), and between the G-2 treatment and the B-C treatment (sDFI 14.44 and 22.16 respectively).

At 24 h of incubation, the InraFreeze® extender tended to improve the sDFI results for all centrifugation protocols, with significant differences (p<0.05) seen between the I-2 and B-C treatments (sDFI 25.94 compared to 39.40), between the I-2 and G-C treatments (sDFI 25.94 compared to 41.83), and between the I-1 and G-C treatments (sDFI 30.55 compared to 41.83).

Table 2 Average DNA fragmentation values associated with the centrifugation+extender treatments (means±SD)

Treatment	sDFI 0	sDFI 4	sDFI 6	sDFI 24
B-C	16.36 ^a ±11,56	22.15 ^b ±11,58	27.01 ^a ±15,66	38.40 ^b ±13,23
B-1	13.23 ^a ±7,08	16.06 ^a ±5,64	27.07 ^a ±7,37	35.95 ^a · b · c ±10,38
B-2	11.86 ^a ±5,87	18.11 ^a · b ±7,32	23.13 ^a ±8,62	33.91 ^a · b · c ±14,50
I-C	14.61 ^a ±5,84	18.43 ^a · b ±7,17	23.51 ^a ±14,28	31.13 ^a · b · c ±15,59
I-1	14.52 ^a ±10,70	19.55 ^a · b ±15,61	20.81 ^a ±9,15	30.54 ^a · b ±16,94
I-2	13.69 ^a ±10,39	14.22 ^a ±8,73	17.81 ^a ±8,45	25.94 ^a ±10,24
G-C	17.01 ^a ±10,64	17.17 ^a · b ±7,19	23.69 ^a ±12,14	41.83 ^c ±19,39
G-1	12.75 ^a ±8,86	17.87 ^a · b ±9,06	24.44 ^a ±11,16	34.99 ^a · b · c ±8,76
G-2	11.96 ^a ±6,23	14.44 ^a ±8,82	22.44 ^a ±17,71	34.74 ^a · b · c ±15,32

DNA fragmentation index values immediately after thawing (sDFI 0) and after 4 (sDFI 4), 6 (sDFI 6) and 24 h (sDFI 24) of incubation. Treatments: C, standard control centrifugation, 1, colloidal centrifugation Protocol 1, 2, colloidal centrifugation Protocol 2, B, Botu-Crio®, I, InraFreeze®, G, Gent®. Letters in superscript represent significant differences between extenders (p<0.05) at each time point.

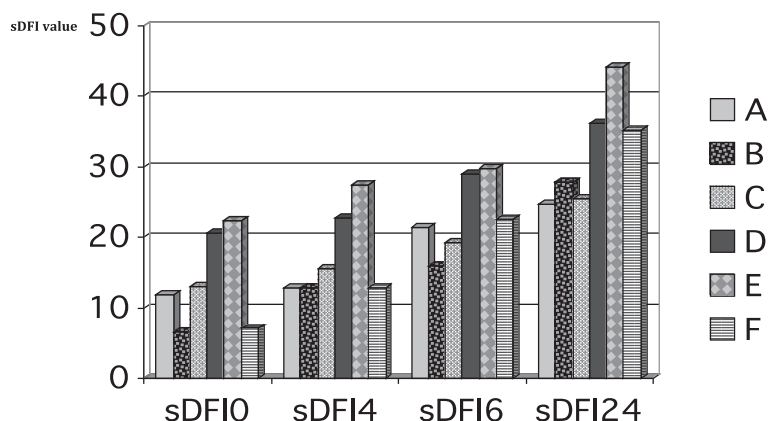


Figure 3 DNA fragmentation values (sDFI) over incubation time for the different stallions. Legend: Average DNA fragmentation index values immediately post-thawing (sDFI 0) and after 4 (sDFI 4), 6 (sDFI 6) and 24 (sDFI 24) hours of incubation. Letters (A-F) represent the different stallions. sDFI values increased significantly with time ($p < 0.05$), but not equally so across all the stallions ($p < 0.05$).

Irrespective of the centrifugation protocol followed, the sDFI values obtained at 6 h of incubation at 37°C were significantly ($p < 0.05$) lower with InraFreeze® extender than with Botu-Crio® extender (Table 3). At 24 h, the sDFI values obtained with the InraFreeze® extender were lower than those obtained with either Botu-Crio® or Gent® extender.

Table 4 shows the sDFI values at different incubation times obtained with the different centrifugation protocols irrespective of the extender used. Both Protocol 1 and 2 returned significantly ($p < 0.05$) lower sDFI values at 0 h than the SCC protocol. At 4 h, only Protocol 2 returned significantly lower sDFI values than the SCC protocol. No significant differences were found between any of the three centrifugation protocols at 6 or 24 h of incubation, although the values returned by Protocol 2 tended to be lower.

Discussion

The present sDFI results show variability between the donor stallions in terms of their post-thaw sperm DNA integrity. This is not surprising given the individual variability commonly seen in stallion sperm [2,3,32]. Horses have undergone selection primarily with pedigree in mind or for their ability to provide a particular type of service. In some cases, however, this has led to reduce fertility [9,15,20,23,33]. In the present work, the range of post-thaw sDFI values immediately after thawing

(6.55-22.46%) recorded is similar to that reported by López-Fernández et al. [9] (4.2-26.3%).

Individual variability was observed in the DNA fragmentation dynamics recorded, as reported earlier by López-Fernández et al. [9]. In the present study, the sDFI values (i.e., DNA fragmentation levels) increased significantly with incubation time, as reported by other authors [6,9,34]. The largest increase occurred between 6 h and 24 h of incubation, not between 1 h and 6 h as described by López-Fernández et al. [9]. This may be significant since there is increasing evidence that the integrity of the sperm chromatin at the actual time of fertilization influences embryo survival [9]; poor sperm DNA integrity may account for some of the infertility commonly thought to lie with mares.

Hoogewijs et al. [28] obtained an average sDFI immediately after thawing of around 12% in colloiddally-selected stallion sperm samples cryopreserved with Botu-Crio®, while Cortés-Gutiérrez et al. [35] reported values of 18-22% in non-colloiddally-selected donkey sperm samples frozen with Gent®. The present results are consistent with the findings of these authors (13.24% for B-1, 11.86% for B-2 and 17.1% for G-C), although different DNA integrity evaluation techniques were used (SCSA, N-Comet Assay and the sperm chromatin dispersion test respectively).

No differences were seen in the sDFI between any of the nine treatments immediately after thawing. However, the use of InraFreeze® was associated with a trend towards

Table 3 Average DNA fragmentation associated with the use of the different freezing extenders (means±SD)

Extender	sDFI 0	sDFI 4	sDFI 6	sDFI 24
Botu-Crio®	13,82 ^a ±8,57	18,78 ^a ±8,76	25,74 ^b ±11,10	36,08 ^b ±12,70
InraFreeze®	14,27 ^a ±9,07	17,40 ^a ±11,15	20,77 ^a ±12,74	29,18 ^a ±14,39
Gent®	13,91 ^a ±8,88	16,49 ^a ±8,36	23,52 ^{a, b} ±13,71	37,19 ^b ±15,20

DNA fragmentation index average values immediately after thawing (sDFI 0) and after 4 (sDFI 4), 6 (sDFI 6) and 24 h (sDFI 24) of incubation. Letters in superscript represent significant differences between extenders ($p < 0.05$) at each time point.

Table 4 Average DNA fragmentation values associated with the different centrifugation protocols (means±SD)

Centrifugation Protocol	sDFI 0	sDFI 4	sDFI 6	sDFI 24
Standard control centrifugation	21.50 ^b ±9,54	24.31 ^b ±8,97	24.74 ^a ±13,91	37.12 ^a ±16,56
Protocol 1	13.50 ^a ±8,85	17.83 ^{a,b} ±10,79	24.17 ^a ±11,41	33.90 ^a ±12,40
Protocol 2	12.50 ^a ±7,66	15.59 ^a ±8,35	21.19 ^a ±12,41	31.53 ^a ±13,86

DNA fragmentation index average values immediately after thawing (sDFI 0) and after 4 (sDFI 4), 6 (sDFI 6) and 24 h (sDFI 24) of incubation. Letters in superscript represent significant differences between extenders ($p < 0.05$) at each time point.

the improvement of the sDFI values, especially at 24 h of incubation; indeed significant differences ($p < 0.05$) were seen between I-2 and B-C, I-2 and G-C, and I-1 and G-C.

Irrespective of the centrifugation protocol followed, InraFreeze[®] significantly reduced the sDFI values at 6 h compared to Botu-Crio[®], and at 24 h of incubation compared to both Botu-Crio[®] and Gent[®]. Some authors report that egg yolk-based extenders better protect chromatin structure than skimmed milk-based extenders, at least in bovine sperm [36]. Carvalho et al. [37], in contrast, report the extender employed to have no influence on DNA integrity. However, it should be noted that, in these two studies, the sDFI was analysed immediately after thawing; no post-thaw incubation study was undertaken - and DNA integrity would be most strongly affected during such an incubation period. The precise mechanism by which egg yolk aids in the protection of spermatozoa during the freeze-thaw process is unknown [38], but low density lipoproteins present in egg yolk plasma are widely presumed to be the cryoprotective agent [38,39]. Further, there is increasing evidence that cryoprotective antagonists may exist in other egg yolk fractions [38,39]. The above may explain the better sDFI values obtained with InraFreeze[®], which contains only egg yolk plasma rather than whole egg yolk as in Botu-Crio[®] and Gent[®]. Replacing egg yolk with sterilized egg yolk plasma might remove a potential source of cryoprotective antagonists [39].

In the present work, single layer colloidal centrifugation prior to cryopreservation (Protocols 1 and 2) led to significantly lower ($p < 0.05$) sDFI values than the SCC protocol immediately after thawing. These data are consistent with those obtained by other authors for human sperm [40,41], fresh equine semen [19-21,25], cooled equine semen [10] and cryopreserved equine semen subjected to colloidal centrifugation before freezing [28,29] or after thawing [17,29]. However, these authors performed no DNA fragmentation dynamics analysis.

The present results showed the I-2 and G-2 treatments to return significantly lower sDFI values than the B-C treatment at 4 h of incubation. At 24 h of incubation, Protocol 2 was associated with the best sDFI values for all three extenders. Crespo et al. [6] found no differences in sDFI values at time 0 of incubation between colloidal, standard or non-centrifuged equine fresh sperm samples, but as we found, after incubation at 37°C samples

subjected to colloidal centrifugation exposed lower sDFI values than non-selected sperm both for fresh and cooled equine semen, what can be related to higher longevity in the selected sperm. Macías García et al. [42] have recently proved that colloidal centrifugation selects a spermatozoa subpopulation that clearly responds differently to osmotic shock, which could better withstand cooling procedures.

Sperm yield obtained from SCC was superior to what is usually described in the literature for simple centrifugation (400–600 g), where average losses are 20-25% [20,31]. However, average sperm yields were similar to those obtained by Hoogewijs et al. [28] for colloidal centrifugation (57.79% vs. 50.9%) protocols. Hoogewijs et al. [28] reported colloidal centrifugation prior to cryopreservation to be associated with lower sperm yields than standard centrifugation. However, we agree with the theory of these authors that indicate that these lower sperm yields might be offset if colloidally-selected sperm better withstood cryopreservation, thus reducing the sperm dose required to guarantee conception.

In the present work most sperm DNA damage occurs during incubation, not in the first minutes after thawing, in concordance with other authors [6,9]. This fact remarks the importance of the use of the dynamic form of the SDF assay for evaluating ex vivo procedures [6]. sDFI values were significantly lower immediately after thawing and remained so in the colloidally-selected samples during the first four hours of incubation (24.31 for the SCC protocol vs. 15.59 for Protocol 2). Although there were no significant differences in sDFI values between the SCC protocol and Protocol 1, in the SCC protocol DNA damage occurred more quickly and was more intense. Crespo et al. [6], López-Fernández et al. [9] and Cortés-Gutiérrez et al. [11] indicate that slower DNA fragmentation dynamics may be associated with greater sperm viability in the female genital tract. The results suggest that colloidal centrifugation before cryopreservation would be beneficial in terms of spermatid survival after insemination with frozen-thawed sperm, although further studies are necessary to confirm a possible relation between our “*in vitro*” observations and “*in vivo*” fertility.

Conclusion

Single layer colloidal centrifugation performed with extended or raw semen prior to cryopreservation reduces

DNA fragmentation during the first four hours after thawing (while incubating at 37°C). Further studies are needed to determine the influence of freezing extenders on equine sperm DNA fragmentation dynamics.

Abbreviations

ROS: Reactive Oxygen Species; SCC: C, Standard Control Centrifugation; 1: Colloidal centrifugation Protocol 1; 2: Colloidal centrifugation Protocol 2; sDFI: Sperm DNA Fragmentation Index; B: Botu-Crio®; I: Inrafreeze®; G: Gent®.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

The study was conceived by CS conceived the study and together with FC and JG participated in its design and coordination. LG-C, AF and FC performed the semen collection, processing of samples for centrifugation and cryopreservation, and helped by MAR, JG and CS performed the sDFI dynamic assay. LG and CS did the statistical analysis and with FC interpreted the data. The manuscript was written by LG-C helped by CS, AF, MAR, FC and JG revised it critically. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

The authors are indebted to the FESCCR for their assistance in this work, to Pedro Cuesta for statistical assistance, and Adrian Burton for editorial and language assistance. This study was funded by Equipos Veterinarios-Biológicos, S.L. Gutiérrez-Cepeda, L. was supported by MICINN FPU fellowship AP2008-02034.

Author details

¹Animal Medicine and Surgery Department, Veterinary Faculty, UCM, Avda. Puerta de Hierro s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. ²Centro Militar de Cría Caballar, (FESCCR-Ministerio de Defensa), Ávila, Spain. ³Halotech DNA, S.L. UAM, Madrid, Spain. ⁴Biology Department, Genetic Unity, UAM, Madrid, Spain.

Received: 10 September 2012 Accepted: 9 October 2012

Published: 5 December 2012

References

1. Metcalf ES: **The efficient use of equine cryopreserved semen.** *Theriogenology* 2007, **68**:423–428.
2. Sieme H, Harrison RAP, Petrunkina AM: **Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion.** *Anim Reprod Sci* 2008, **107**:276–292.
3. Samper JC, Morris CA: **Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey.** *Theriogenology* 1998, **49**:895–903.
4. Kuisma P, Andersson M, Koskinen E, Katila T: **Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods.** *Acta Vet Scand* 2006, **48**:14.
5. Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BAJ, Colenbrander B, Gadella BM: **DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages.** *J Androl* 2006, **27**:176–188.
6. Crespo F, Gosálvez J, Gutiérrez-Cepeda L, Serres C, Johnston SD: **Colloidal centrifugation of stallion semen results in a reduced rate of sperm DNA fragmentation.** *Reprod Dom Anim* 2012, doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02140.x ISSN 0936–6768.
7. Love CC, Kenney RM: **The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion.** *Theriogenology* 1998, **50**:955–972.
8. Madrid-Bury N, Pérez-Gutiérrez JF, Pérez-Garnelo S, Moreira P, Sanjuanbenito BP, Gutiérrez-Adán A, de la Fuente Martínez J: **Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa.** *Theriogenology* 2005, **64**:232–241.
9. López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández JL, Arana P, Johnston SD, Gosálvez J: **Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion.** *Theriogenology* 2007, **68**:1240–1250.
10. Morrell JM, Johannisson H, Strutz H, Dalin A-M, Rodríguez-Martínez H: **Colloidal centrifugation of stallion semen: changes in sperm motility, velocity, and chromatin integrity during storage.** *J Equine Vet Sci* 2009, **29**(Suppl 1):24–32.
11. Cortés-Gutiérrez EI, Crespo F, Gosálvez A, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Gosálvez J: **DNA fragmentation in frozen sperm of Equus asinus: Zamorano_Leonés, a breed at risk of extinction.** *Theriogenology* 2008, **69**:1022–1032.
12. Loomis PR, Graham JK: **Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion.** *Anim Reprod Sci* 2008, **105**:119–128.
13. Macpherson ML, Blanchard TL, Love CC, Brinsko SP, Varner DD: **Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallion.** *Theriogenology* 2002, **58**:317–320.
14. Edmond AJ, Teague SR, Brinsko SP, Comerford KL, Waite JA, Mancill SS, Love CC, Varner DD: **Effect of density-gradient centrifugation on quality and recovery rate of equine spermatozoa.** *Anim Reprod Sci* 2008, **107**(Suppl 3–4):318.
15. Morrell JM, Dalin A-M, Rodríguez-Martínez H: **Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study.** *Anim Reprod Sci* 2008, **5**(Suppl 3–4):121–126.
16. Morrell JM, Pihla J, Dalin A-M, Johannisson A: **Restoration of seminal plasma to stallion spermatozoa selected by colloid centrifugation increases sperm progressive motility but is detrimental to chromatin integrity.** *Theriogenology* 2012, **78**:345–352.
17. Macías García B, Morrell JM, Ortega-Ferrusola C, González-Fernández L, Tapia JA, Rodríguez-Martínez H, Peña FJ: **Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen.** *Anim Reprod Sci* 2009, **114**:193–202.
18. Macías García B, González Fernández L, Morrell JM, Ortega Ferrusola C, Tapia JA, Rodríguez Martínez H, Peña FJ: **Single-layer centrifugation through colloid positively modifies the sperm subpopulation structure of frozen-thawed stallion spermatozoa.** *Reprod Dom Anim* 2009, **44**:523–526.
19. Johannisson A, Morrell JM, Thorén J, Jönsson M, Dalin A-M, Rodríguez-Martínez H: **Colloidal centrifugation with Androcoll-ETM prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity.** *Anim Reprod Sci* 2009, **116**(Suppl 1–2):119–128.
20. Morrell JM, Johannisson A, Dalin A-M, Rodríguez-Martínez H: **Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single layer centrifugation through silica colloids.** *Reprod Dom Anim* 2009, **44**:512–517.
21. Gutiérrez-Cepeda L, Fernández A, Crespo F, Gosálvez J, Serres C: **Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated to the clinical equine sperm processing procedure.** *Anim Reprod Sci* 2011, **124**(Suppl 1–2):85–89.
22. Loomis PR: **Advanced methods for handling and preparation of stallion semen.** *Vet Clin N Am: Equine* 2006, **22**(3):663–676.
23. Morrell JM, Dalin A-M, Rodríguez-Martínez H: **Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: Yield, motility and survival.** *Equine Vet J* 2009, **41**(Suppl 1):53–58.
24. Morrell JM, Saravia F, Van Wienen M, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H: **Selection of boar spermatozoa using centrifugation on a glycidoxypropyltrimethoxylane-coated silica colloid.** *J Reprod Dev* 2009, **55**:547–552.
25. Morrell JM, Johannisson A, Dalin A-M, Rodríguez-Martínez H: **Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scale up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily.** *Theriogenology* 2009, **72**:879–884.
26. Ortega-Ferrusola C, González-Fernández L, Muriel A, Macías-García B, Rodríguez-Martínez H, Tapia JA, Peña FJ: **Does the Microbial Flora in the Ejaculate Affect the Freezability of Stallion Sperm.** *Reprod Dom Anim* 2009, **44**:518–522.
27. Morrell JM, Rodríguez-Martínez H, Johannisson A: **Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared with sperm washing.** *Reprod Biomed Online* 2010, **21**:429–436.
28. Hoogewijs M, Morrell J, Van Soom A, Govaere J, Johannisson A, Piepers S, De Schauwer C, De Kruijff A, De Vlieghe S: **Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality.** *Equine Vet J* 2011, **43**(Suppl 40):35–41.

29. Mancill SS, Love CC, Brinsko SP, Edmond AJ, Foster ML, Teague JA: **Effect of density gradient centrifugation on cryopreservation of equine spermatozoa.** *Anim Reprod Sci* 2010, **121**:208–209.
30. Cochran JD, Amann RP, Froman DP, Pickett BW: **Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm.** *Theriogenology* 1984, **22**:25–38.
31. Pickett BW, Amann RP: **Cryopreservation of semen.** In *Equine Reproduction*. 2nd edition. Edited by McKinnon AO, Voss JL. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993:775–780.
32. Aurich C: **Recent advances in cooled-semen technology.** *Anim Reprod Sci* 2008, **107**:268–275.
33. Colenbrander B, Gadella BM, Stout TA: **The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility.** *Reprod Domest Anim* 2003, **38**:305–11.
34. Linfor JJ, Meyers SA: **Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single cell gel electrophoresis.** *J Androl* 2002, **23**:107–113.
35. Cortés-Gutiérrez E, Crespo F, Serres-Dalmau C, Rozas AL Gdl, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Gosálvez J: **Assessment of Sperm DNA Fragmentation in Stallion (*Equus caballus*) and Donkey (*Eweus asinus*) Using the Sperm Chromatin Dispersion Test.** *Reprod Dom Anim* 2009, **44**:823–828.
36. Karabinus DS, Evenson DP, Kaproth MT: **Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm.** *J Dairy Sci* 1999, **74**:3836–3848.
37. Carvalho EC, Paes de Arruda R, Furugen A, Nascimento J, Fernandes J, Mazza PE: **Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin.** *Anim Reprod Sci* 2008, **104**:119–131.
38. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M: **Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen.** *Theriogenology* 2002, **57**(Suppl 6):1695–1706.
39. Pillet E, Duchamp G, Batellier F, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M: **Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders.** *Theriogenology* 2011, **75**(Suppl 1):105–114.
40. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U: **The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies.** *Hum Reprod* 2000, **15**(Supple 5):1112–1116.
41. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D: **Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception.** *Hum Reprod* 2001, **16**(Supple 10):2160–2165.
42. Macías-García B, González-Fernández L, Gallardo-Bolaños JM, Peña FJ, Johannisson A, Morrell JM: **Androcoll-E large selects a subset of live stallion spermatozoa capable of producing ROS.** *Anim Reprod Sci* 2012, **132**:74–82.

doi:10.1186/1751-0147-54-72

Cite this article as: Gutiérrez-Cepeda *et al.*: The effect of two pre-cryopreservation single layer colloidal centrifugation protocols in combination with different freezing extenders on the fragmentation dynamics of thawed equine sperm DNA. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2012 **54**:72.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



CAPÍTULO 7: ARTÍCULO 4



Reproduction
in Domestic Animals


 A red rectangular banner with the text "Reproduction in Domestic Animals" in white. The background of the banner features a faint, artistic image of what appears to be a network of blood vessels or a similar biological structure.

Reproduction
in Domestic Animals

**Equine sperm cryopreservation efficiency optimization by
colloidal centrifugation**

Journal:	<i>Reproduction in Domestic Animals</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Gutierrez-Cepeda, Luna; Veterinary Faculty, UCM, Animal Medicine and Surgery Crespo, Francisco; Centro Militar de Cría Caballar, CCFAA Blázquez, Juan; Centro Militar de Cría Caballar, CCFAA Serres, Consuelo; Veterinary Faculty, UCM, Animal Medicine and Surgery
Subject Area:	Andrology < General reproduction, equine < Species:, Biotechnology < General reproduction, Cryobiology < General reproduction

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

1
2
3 1 Animal Medicine and Surgery Department, Veterinary Faculty, UCM, Madrid,
4
5 2 Spain and Centro Militar de Cría Caballar, (CCFAA), Ávila, Spain
6
7
8
9

10 4 **Equine sperm cryopreservation efficiency optimization by colloidal**
11 **centrifugation**
12
13
14
15

16 7 Madrid, Spain L Gutiérrez-Cepeda

17
18 8 Ávila, Spain F Crespo

19
20 9 Ávila, Spain JC Blázquez

21
22 10 Madrid, Spain C Serres
23
24
25
26

27 12 Abridged title – Incorporation of single layer centrifugation in the freeze-test
28
29
30
31

32 14 **Contents**

33
34 15 Equine cryopreserved semen is still less used comparing to others species due to
35
36 16 spermatic survival problems and individual variability. Colloidal purifying systems
37
38 17 are proven to improve sperm quality. In this study we investigated if the
39
40 18 incorporation of single layer colloidal centrifugation prior cryopreservation in
41
42 19 clinical conditions could increase the number of stallions or ejaculates suitable for
43
44 20 this processing, observing the influence of centrifugation and freezing extender
45
46 21 protocol in post-thawed sperm motility. Using colloidal centrifugation prior to
47
48 22 cryopreservation the percentage of ejaculates available to be frozen was increased
49
50 23 from 35% (6/17) to 71% (12/17), doubling the number of samples that could have
51
52 24 been subjected to cryopreservation. We only found significant differences in post-
53
54 25 thawed sperm parameters in LIN and ALH after 5 minutes of incubation at 37°C
55
56
57
58
59
60

1
2
3 26 between colloidal and simple centrifugation processing techniques. Although no
4
5 27 significant differences were found between the two different colloidal protocols in
6
7 28 any of the variables considered. Colloidal centrifugation allowed obtaining, from
8
9 29 worse fresh quality ejaculates, thawed sperm doses with similar quality to that of
10
11 30 good quality ejaculates. BotuCrio® freezing extender better optimized motility
12
13 31 parameters and its characteristics. Colloidal centrifugation optimizes the efficiency
14
15 32 of the cryopreservation technique as it allows increasing the number of ejaculates
16
17 33 and stallions suitable to be frozen. Including new semen processing techniques in
18
19 34 the freeze-test could help to optimize the equine sperm cryopreservation protocols
20
21 35 especially when dealing with individuals or breeds which initially low sperm
22
23 36 quality prevents or limits their inclusion in sperm cryopreservation programs.
24
25
26
27
28
29

30 **1. Introduction**

31
32 39 Gametes and embryo recollection and conservation, through modern reproductive
33
34 40 technologies allows a more rational use of the genetic material of an specie, helping
35
36 41 to multiply the number of high genetic value individuals.. In Equine industry,
37
38 42 artificial insemination techniques have been greatly developed, although
39
40 43 cryopreserved semen is still less used comparing to others species due to spermatoc
41
42 44 survival problems and individual variability (Loomis and Graham 2008).
43
44
45

46
47 46 The development of an appropriated freezing-thawing sperm protocol requires
48
49 47 maintaining spermatoc functions after thawing and new products and extenders are
50
51 48 incorporated to the procedure in order to optimize the results in the greatest number
52
53 49 of equine individuals. The first step and a premise in a freezing protocol is to have a
54
55 50 good fresh sperm quality. Most equine sperm cooling-freezing researchers
56
57
58
59
60

1
2
3 51 recommend using only ejaculates with more than 50% or 60% of progressive
4
5 52 motility to obtain satisfactory results (Loomis and Graham,2008). In this context,
6
7 53 Purebred Spanish Horses (P.R.E horses) are characterized for having a very narrow
8
9
10 54 number of stallions with more than 50% of progressive motility fresh ejaculates
11
12 55 (Benito et al. 2003).

13
14 56
15
16 57 Moreover, stallions are traditionally classified as “Good/Bad Coolers/Freezers”
17
18 58 according to their sperm susceptibility to these techniques (Loomis 2006). This
19
20 59 individual variability has also been established between breeds (Alvarenga et al.
21
22 60 2003). In general, 35% of stallions are considered to have a good frozen-thawed
23
24 61 sperm quality, 25% average frozen-thawed quality and the other 40% are not
25
26 62 suitable for cryopreservation (Loomis and Graham 2008). Due to its low fresh
27
28 63 sperm quality in P.R.E horses, only 15% of stallions offers suitable cryopreserved
29
30 64 sperm doses for sale. All these limitations determine that artificial insemination
31
32 65 with frozen semen in P.R.E horses is less widespread than in other breeds and
33
34 66 finding systems and procedures to increase the number of stallions and ejaculates
35
36 67 suitable to be cooled and cryopreserved is and important goal.

37
38
39 68
40
41
42 69 Colloidal purifying systems are proven to improve sperm quality (Macías García et
43
44 70 al.,2009; Morrell et al. 2009; Mancill et al. 2010) and its use is recommend to
45
46 71 improve fertility in subfertile stallions (Loomis 2006; Varner et al. 2008). The
47
48 72 development of colloidal centrifugation protocols compatible with clinic procedures
49
50 73 (Gutiérrez-Cepeda et al. 2011; Morrell 2012) has allowed us to evaluate if the
51
52 74 incorporation of this type of products to the freezing protocol of low quality sperm
53
54 75 equine breeds (as P.R.E. horses) could improve the success of this technique.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 76

4
5 77 In clinical practice, due to individual variability, it is necessary to perform a freeze-
6
7 78 test in order to establish which extender better optimize results (Loomis and
8
9 79 Graham 2008).
10

11 80

12
13
14 81 In this study we investigated if the incorporation of two different single layer
15
16 82 colloidal centrifugation protocols prior cryopreservation in clinical conditions could
17
18 83 increase the number of stallions or ejaculates suitable for this processing, observing
19
20 84 the influence of centrifugation and freezing extender protocol in post-thawed sperm
21
22 85 motility.
23

24
25 86

27 87 **2. Material and Methods**

28 29 88 **2.1 Animals**

30
31
32 89 A total of six Purebred Spanish Horses (P.R.E. horses), located at Centro Militar de
33
34 90 Cría Caballar de Ávila (CCFAA) (40,66:N 4,70:W) in Spain, were used. Stallions
35
36 91 ranged in aged from 7 to 15 years, were kept under controlled feeding and housing
37
38 92 conditions, and were clinically healthy and with documented fertility.
39

40
41 93

42 43 94 **2.2 Semen collection**

44
45 95 Semen was collected by allowing the stallions to mount a phantom and ejaculate
46
47 96 into a Missouri-model artificial vagina (Nasco, Fort Atkinson, WI), lubricated with
48
49 97 a sterile non-spermicidal gel (IMV technologies, L'Aigle, France) and warmed to
50
51 98 45-50°C prior to collection. Semen was filter to capture gel. Stallions were
52
53 99 collected on a regular basis (two collections/week) and a mare in estrous was used
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 100 as sexual stimulation. A total of three ejaculates per stallion were used, except from
4
5 101 stallion D in which only two ejaculates were processed.
6

7 102
8

9 103 **2.3 Fresh ejaculate evaluation**

10 104 The 17 collected, gel-free ejaculates were immediately transported to the laboratory
11
12
13 105 and maintain at 37°C for evaluation and processing
14
15

16 106
17

18 107 Spermatozoa concentration and motion characteristics were evaluated using a
19
20 108 computer-assisted sperm motion analyzer microscope (Sperm Class Analyzer®,
21
22 109 Microptic SL, Barcelona, Spain) equipped with a heated stage and phase contrast
23
24 110 optics (20× objective, Optiphot-2, Nikon, Japan). Warmed (37 °C) analysis
25
26 111 chambers (fixed height of 20 µm) affixed to microscope slides (Leja Standard
27
28 112 Count 2 chamber slides; Leja Products, B.V., Nienw-Vennep, The Netherlands)
29
30 113 were loaded with 2 µl volume of extended semen. The major settings used for
31
32 114 CASA were as follows: STR threshold for progressive motility, 60%; LIN
33
34 115 threshold for circular spermatozoa, 50%; 32 frames per sequence; minimum of 15
35
36 116 frames per object; minimum area for objects 25 pix and 10mm/s as velocity limit
37
38 117 for immobile objects. A minimum of 500 spermatozoa were analyzed per sample.
39
40 118 Experimental endpoints included: percentage of motile sperm (%; MOT) and
41
42 119 percentage of progressively motile sperm (%; PMOT).
43
44
45
46

47 120
48

49 121 Ejaculates which progressive motility in fresh semen was higher than 60% were
50
51 122 classified as “Suitable for Cryopreservation” (SC) (Loomis and Graham 2008) and
52
53 123 were subjected to the standard cryopreservation protocol which includes simple
54
55 124 centrifugation. Ejaculates which progressive motility in fresh semen was lower than
56
57
58
59
60

1
2
3 125 60% were classified as “Non Suitable for Cryopreservation” and were processed
4
5 126 through colloidal centrifugation (Protocols 1 and 2).
6

7 127

8 9 128 **2.4 Semen centrifugation**

10
11 129 **Simple Centrifugation:** Ejaculates “Suitable for Cryopreservation” were subjected
12
13 130 to simple centrifugation by pipetting 10ml of extended semen (1:1, v:v in Inra96[®])
14
15 131 in a 50ml falcon tube and centrifuged at 450g x 7 min (Loomis 2006).
16
17

18 132 **Colloidal Centrifugation:** Ejaculates “Non Suitable for Cryopreservation” were
19
20 133 subjected to two different colloidal centrifugation protocols with the higher density
21
22 134 layer of the Equipure[®] product (Bottom Layer) (Nidacon, International AB,
23
24 135 Mölndal, Sweden) in 50ml falcon tubes by pipetting with care to avoid mixing
25
26 136 phases 10ml of extended semen (1:1, v:v in Inra96[®]) over 10ml of the colloid
27
28 137 (Protocol 1) or 5ml of raw semen over 5ml of the colloid (Protocol 2) tempered at
29
30 138 22°C and centrifuged at 300g x 20 min as described by Gutiérrez-Cepeda et al.
31
32 139 (2011).
33
34
35

36 140

37 38 141 **2.5 After centrifugation sperm evaluation and sample selection**

39
40 142 After centrifugation the supernatant and most of the gradient material was removed
41
42 143 by aspiration an aliquot of the resulting homogenized sperm pellet was added to a
43
44 144 tube containing 1ml of tempered INRA96[®] to obtain a final concentration of
45
46 145 50×10^6 spermatozoa/ml.
47

48
49 146 Samples which progressive motility increased $\geq 60\%$ after colloidal centrifugation
50
51 147 were classified as “Acceptable After Colloidal Centrifugation”, distinguishing
52
53 148 between “Acceptable After Colloidal Centrifugation with Protocol 1”, (AACC1)
54
55 149 and “Acceptable After Colloidal Centrifugation with Protocol 2”, (AACC2). Semen
56
57
58
59
60

1
2
3 150 samples, which did not rise up to 60% after colloidal centrifugation, were not
4
5 151 processed (Non Processed Samples, NP).

6
7 152 Samples with $\geq 60\%$ progressive motility either in fresh semen or after colloidal
8
9 153 centrifugation (SC, AACC1 and AACC2) were processed for cryopreservation.

10
11
12 154

13
14 155 Figure 1

15
16 156

17 18 157 **2.6 Freeze-test**

19
20 158 A total of fourteen samples were finally processed for cryopreservation Each
21
22 159 sample was subjected to three different freezing protocols with three different
23
24 160 freezing extenders commonly used in the equine reproductive industry, modified
25
26 161 Lactose-EDTA (Martin et al. 1979), InraFreeze® (IMV technologies, L'Aigle,
27
28 162 France) and Botu-Crio® (BioTech, Botucatu, Sao Paulo, Brazil). The required
29
30 163 volume of each pellet to obtain a final concentration of 50×10^6 spermatozoa/ml
31
32 164 was added to a fixed volume of 5ml of each extender. After resuspension, semen
33
34 165 was packed into 0.5ml polyvinylchloride straws (IMV International, St Paul, MM).

35
36 166 Cooling rate used was that described for each extender:

- 37
38 167 - Lactose-EDTA: straws were frozen directly (Silva et al. 1997).
39
40 168 - InraFreeze®: straws were frozen after being slowly cooled to 4°C (-
41
42 169 0.3°C/min) within an hour as recommended by the manufacturer.
43
44 170 - BotuCrio®: straws were frozen after being cooled at 4-6°C for 20 minutes
45
46 171 as recommended by the manufacturer.

47
48 172 Then the straws were frozen horizontally in racks placed 4cm above the surface of
49
50 173 liquid nitrogen for 7 min, after which they were directly plunged in liquid nitrogen.

51
52
53 174
54
55
56
57
58
59
60

175 **2.7 Post-Thaw Sperm Evaluation**

176 After 4 weeks of storage, straws were thawed by immersion in a 37°C water bath
177 for 1 min. Spermatozoa motion characteristics were evaluated using a computer-
178 assisted sperm motion analyzer microscope (Sperm Class Analyzer®, Microptic
179 SL, Barcelona, Spain) as described in chapter 2.3 Experimental endpoints included:
180 percentage of motile sperm (%; MOT); percentage of progressively motile sperm
181 (%; PMOT); curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL); straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL);
182 average path velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP); linearity (%; LIN); straightness (%; STR);
183 amplitude of lateral displacement (μm ; ALH) and beatcross-frequency (Hz; BCF).

184
185 A minimum of 500 spermatozoa per sample were counted. The analysis was
186 performed 5 and 30 minutes after thawing.

188 **2.8 Statistical Analysis**

189 The effect of centrifugation and freezing extender treatment on the different
190 motility variables was determined by ANOVA and Duncan Tests, both in general
191 and within each group (SC and AACC). The effect of the stallion variability was
192 considered in the analysis. Significance was set at $p < 0.05$. Data were processed
193 using the SPSS-19 statistical package.

195 **3. Results**

196 **3.1 Prior Cryopreservation Evaluation**

197 Progressive motility values for fresh semen and after centrifugation protocols are
198 shown in Table 1.

199

1
2
3 200 Table 1
4

5 201
6

7 202 From the total seventeen ejaculates, six presented progressive motility over 60% in
8
9 203 fresh sperm (in **bold** in the table). A total of fourteen samples were processed for
10
11 204 cryopreservation, six of those were suitable for freezing according to their fresh
12
13 205 sperm quality (Suitable for Cryopreservation, SC), and the other eight obtained
14
15 206 enough quality for being cryopreserved after colloidal centrifugation (Acceptable
16
17 207 After Colloidal Centrifugation, AACC) Five ejaculates did not obtained enough
18
19 208 quality to be cryopreserved (Non Processed, NP).
20
21
22

23 209

24 210 **3.2 Post-Thaw Evaluation**

25
26
27 211 When studying freezing diluents and centrifugation protocols, we observed
28
29 212 significant differences between horses ($p < 0.05$) in all variables considered. The
30
31 213 effect of stallion was then considered when analyzing statistically the effect of the
32
33 214 different treatments of the study. However, these differences between stallions were
34
35 215 reduced within the SC and AACC groups.
36
37

38 216

39
40
41 217 Differences in post-thawing values after 5 and 30 minutes of incubation between
42
43 218 groups are shown in Table 2 and 3 respectively. There were only significant
44
45 219 differences in variables LIN5 where AACC obtained higher values, and in ALH5
46
47 220 where SC presented a significant increased.
48

49 221

50
51
52 222 Table 2

53
54 223 Table 3

55
56 224
57
58
59
60

1
2
3 225 Subsequently differences between the different extenders of the freeze-test were
4
5 226 observed in post-thawing motility parameters within the Suitable for
6
7 227 Cryopreservation group (SC) (Table 4 and 5).
8

9
10 228

11
12 229 Table 4

13
14 230 Table 5

15
16 231

17
18 232 In the SC group Botucrio® freezing extender produced significant higher values
19
20 233 then the others diluents in PMOT and BCF both 5 and 30 minutes after thawing.

21
22 234 When considering velocity parameters both Botucrio® and Lac-Edta were higher
23
24 235 than InraFreeze®, finding significant differences 5 minutes after thawing in VCL
25
26 236 and VSL for Botucrio® and in VCL for Lac-Edta and 30 minutes after thawing in
27
28 237 all velocity parameters for both freezing extenders with no differences between
29
30 238 them.
31
32

33
34 239

35
36 240 Tables 6 and 7 represent the differences between freeze-test extenders in post-
37
38 241 thawing motility parameters within the Acceptable After Colloidal Centrifugation
39
40 242 group (AACC).
41

42
43 243

44
45 244 Table 6

46
47 245 Table 7

48
49 246

50
51 247 Regarding the AACC group, MOT and PMOT both 5 and 30 minutes post-thawing
52
53 248 were significantly higher ($p < 0.05$) with BotuCrio® than with the other extenders
54
55 249 considered. STR 5 minutes after thawing was significantly higher for BotuCrio®
56
57
58
59
60

1
2
3 250 than for Lac-Edta but similar to InraFreeze® and LIN5 was significantly lower with
4
5 251 InraFreeze® than with the others.

6
7 252

8
9 253 **4. Discussion**

10
11 254 When studying seminal characteristics in the seventeen fresh ejaculates (Table 1),
12
13 255 we observed that only eight of the seventeen ejaculates (47,09%) presented a
14
15 256 progressive motility over 50%. This fact reflects the low sperm quality of the
16
17 257 P.R.E. horses, as previously described by Benito et al. (2003).
18
19 258

20
21 259 Only six of the seventeen total ejaculates presented progressive motility over 60%
22
23 260 in fresh sperm. According to different authors recommendations, only 35,29% of
24
25 261 the ejaculates could have been processed to standard cryopreservation (SC) in our
26
27 262 experiment (Loomis and Graham 2008).
28
29 263

30
31 264 Among the six stallions included in the study, only stallion A presented enough
32
33 265 fresh quality to process his three ejaculates. For the 83,3% of the individuals
34
35 266 (horses B, C, D, E and F) single layer colloidal centrifugation with Equipure® was
36
37 267 necessary to improved semen quality in all or some of their ejaculates.
38
39 268

40
41 269 Between the eleven ejaculates “Non Suitable for Cryopreservation” (progressive
42
43 270 motility in fresh sperm lower than 60%) six obtained enough motility to be
44
45 271 included in the freeze-test when subjected to colloidal centrifugation protocols.
46
47 272 Therefore, using colloidal centrifugation prior to cryopreservation we increased
48
49 273 from 35% (6/17) to 71% (12/17) the percentage of ejaculates available to be freeze,
50
51 274 doubling the number of samples that could be subjected to cryopreservation.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 275

4
5 276 A total of fourteen samples were processed for cryopreservation, six were suitable
6
7 277 for freezing according to their fresh sperm quality (SC), and eight were suitable for
8
9 278 cryopreservation after colloidal centrifugation (AACC). No important significant
10
11 279 differences were found between the two different colloidal protocols, what had
12
13 280 been previously described (Gutiérrez-Cepeda et al. 2011). However, Protocol 1 was
14
15 281 more effective as it improved five of six of the ejaculates “Non Suitable for
16
17 282 Cryopreservation” whereas Protocol 2 only optimized three, being this
18
19 283 improvement exclusive for the colloidal centrifugation Protocol 2 only in ejaculate
20
21 284 E1.
22
23
24

25 285

26
27 286 When comparing centrifugation protocols we only found significant differences in
28
29 287 LIN5 and ALH5, showing that the quality of the frozen-thawed samples from low
30
31 288 quality ejaculates (subjected to colloidal procedure) was similar to those samples
32
33 289 from good quality ejaculates (subjected to simple centrifugation). From worse fresh
34
35 290 quality ejaculates, we obtained thawed sperm doses with similar sperm quality to
36
37 291 that of good quality ejaculates. Quality similarity was maintained between
38
39 292 centrifugation protocols after 30 minutes of incubation at 37°C. Hoogewijs et al.
40
41 293 (2012) also determined that colloidal centrifugation prior cryopreservation
42
43 294 improved sperm quality of thawed samples versus cushion centrifugation.
44
45
46

47 295

48
49 296 Colloidal purifying systems are proven to improve fresh sperm quality (Morrell,
50
51 297 2012) and improve and maintain sperm quality during storage at 5°C (Johannisson
52
53 298 et al., 2009). Regarding sperm cryopreservation in human reproduction, since early
54
55 299 90s, colloidal centrifugation techniques has been used to select a superior sperm
56
57
58
59
60

1
2
3 300 sample that better withstands the cryopreservation process obtaining thawing sperm
4
5 301 samples with better quality compared to non selected-samples (Pérez-Sánchez et al.
6
7 302 1994; Sharma and Agarwal 1996). Colloidal centrifugation has proved to improve
8
9 303 equine sperm quality when applied over thawed samples compared to non-selective
10
11 304 techniques (Macías García et al. 2009; Mancill et al. 2010). When applying
12
13 305 colloidal centrifugation prior cryopreservation of equine sperm, Hoogewijs et al.
14
15 306 (2011) found an improvement in quality both before and after cryopreservation
16
17 307 when colloidal centrifugation was performed compared to non-selective techniques
18
19 308 but this effect was higher in stallions classified as “Non Suitable for
20
21 309 Cryopreservation” (stallions that produced post-thawing progressive motility
22
23 310 <30%). Similarly, Mancill et al. (2010) found higher thawing sperm quality in
24
25 311 “subfertile stallions” when colloidal centrifugation was performed, although no
26
27 312 differences were found between centrifugation techniques within the fertile group.
28
29
30
31

32 313
33
34 314 We did not find significant differences between samples processed through
35
36 315 colloidal and simple centrifugation. This could be because, unlike Mancill and
37
38 316 Hoogewijs studies, only low quality ejaculates were subjected to colloidal
39
40 317 centrifugation.
41
42
43

44 318
45 319 Regarding our results of freezing diluents, we can determine that BotuCrio®
46
47 320 freezing extender better optimized motility parameters and its characteristics
48
49 321 comparing to the other freezing extenders analyzed both in the SC and AACC
50
51 322 groups. It improves progressive motility both immediately and after 30 minutes of
52
53 323 incubation when comparing to the others. For velocity parameters (VCL, VSL and
54
55 324 VAP) Lac-Edta was superior to IntraFreeze®.
56
57
58
59
60

1
2
3 325

4
5 326 This superiority could be related with its cryoprotectants combination, which
6
7 327 includes a lower Glycerol concentration and Metilformamine. Both InraFreeze®
8
9 328 and Lac-Edta diluents include Glycerol as the only cryoprotectant agent. It has been
10
11 329 published that sperm cryopreservation with amines as cryoprotectant are effective
12
13 330 in improving motility, viability in the female genital tract and fertility of frozen-
14
15 331 thawed sperm, as well as in reducing individual and breed variability, mainly in
16
17 332 horses classified as “bad freezers” (Alvarenga et al. 2003; Melo et al. 2007).
18
19

20
21 333

22
23 334 The development of new freezing extenders, as it seemed to happen with amides
24
25 335 (Alvarenga et al. 2005), in combination with sperm selection techniques can be use
26
27 336 in equine reproduction clinics to optimize sperm cryopreservation, especially when
28
29 337 dealing with low fresh sperm quality breeds, what limits their inclusion in freezing
30
31 338 commercial protocols.
32
33

34 339

35
36 340 When studying freezing diluents and centrifugation protocols, there were
37
38 341 significant differences between horses ($p < 0.05$) in all variables considered, what
39
40 342 reflects the characteristic individual sperm-response variability among horse
41
42 343 population (Loomis and Graham 2008).
43
44

45 344

46
47 345 Colloidal centrifugation selects a sperm subpopulation that responds different to
48
49 346 osmotic shock (Hoogewijs et al. 2011; Macías García et al. 2012). This fact could
50
51 347 be related to lower ROS production and contamination achieved after colloidal
52
53 348 centrifugation and could help to withstand the cryopreservation process (Hoogewijs
54
55 349 et al. 2011).
56
57
58
59
60

1
2
3 350

4
5 351 As described by Mancill et al. (2010) we believe that the incorporation of colloidal
6
7 352 centrifugation prior to cryopreservation in fertile stallions is not worth as it
8
9 353 determines an additional processing step, which causes a significant loss of
10
11 354 presumably normal sperm and increases economic and technical costs
12
13 355 unnecessarily. The importance of stallion selection has also been described by
14
15 356 others (Hoogewijs et al. 2011). However, and in agreement with Hoogewijs et al.
16
17 357 (2011) we believe that the clinical incorporation of colloidal centrifugation in low
18
19 358 quality ejaculates in cryopreservation protocols has a great interest, as it increases
20
21 359 the efficiency of the freezing technique when dealing with low fresh quality
22
23 360 ejaculates as the number of ejaculates suitable for cryopreservation in each stallion
24
25 361 is raised.
26
27
28
29

30 362

31
32 363 **5. Conclusion**

33
34 364 Colloidal centrifugation optimizes the efficiency of the cryopreservation technique
35
36 365 as it allows increasing the number of ejaculates and stallions suitable to be frozen
37
38 366 with similar post-thawing characteristics compared to simple centrifugation.
39
40 367 Including new semen processing techniques in the freeze-test could help to
41
42 368 optimize the equine sperm cryopreservation protocols. These results could have a
43
44 369 great interest in the equine reproductive industry when dealing with individuals or
45
46 370 breeds which initially low sperm quality prevents or limits their inclusion in sperm
47
48 371 cryopreservation programs.
49

50 372

51
52
53 373 **Acknowledgements**

54
55 374 The authors are indebted to the FESCCR for their assistance in this work.
56
57
58
59
60

1
2
3 375 Gutiérrez-Cepeda, L. was supported by MICINN FPU fellowship AP2008-02034.
4
5 376

6
7 377 **References**
8

9
10 378 Alvarenga MA, Leao KM, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL,
11
12 379 Gomes GM, 2003: The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen.
13
14 380 In: Squires E and Wade JF (ed), Proceedings of a Workshop on Transporting
15
16 381 Gametes and Embryos, Havemeyer Foundation, R&W Publications Limited
17
18 382 Newmarket, UK, pp. 74–76.
19

20
21 383 Alvarenga MA, 2005: Amides as cryoprotectant for freezing stallion semen: a
22
23 384 review. *Anim Reprod Sci* **89**, 105-113.
24

25 385 Benito D, Alvarez A, Crespo F, Mateos E, Gómez-Cuétara C, Serres C, 2003:
26
27 386 Análisis computerizado del semen de caballo de Pura Raza Española. IV Congreso
28
29 387 Ibérico de Reproducción Animal, Las Palmas, España.
30

31
32 388 Gutiérrez-Cepeda L, Fernández A, Crespo F, Gósalvez J, Serres C, 2011:
33
34 389 Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated to the
35
36 390 clinical equine sperm processing procedure. *Anim Reprod Sci* **124**(1-2), 85-89.
37

38
39 391 Hoogewijs M, Morrell J, Van Soom A, Govaere J, Johannisson A, Piepers S,
40
41 392 De Schauwer C, De Kruif A, De Vliegher S, 2011: Sperm selection using single
42
43 393 layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality.
44
45 394 *Equine Vet J* **43**(40), 35–41.
46

47
48 395 Hoogewijs M, Piepers, S, Govaere J, De Schauwer C, de Kruif A, Morrell J,
49
50 396 2012: Sperm longevity following pre-freeze sperm selection. *J Equine Vet Sci*
51
52 397 **32**(8), 489.
53

54
55 398 Johannisson A, Morrell JM, Thorén J, Jönsson M, Dalin AM, Rodriguez-
56
57 399 Martinez H, 2009: Colloidal centrifugation with Androcoll-ETM prolongs stallion
58
59
60

1
2
3 400 sperm motility, viability and chromatin integrity. *Anim Reprod Sci* **116**(1-2), 119-
4
5 401 128.

6
7 402 Loomis PR, 2006: Advanced methods for handling and preparation of stallion
8
9 403 semen. *Vet Clin N Am: Equine* **22**(3), 663–676.

10
11 404 Loomis PR, Graham JK, 2008: Commercial semen freezing: individual male
12
13 405 variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing
14
15 406 protocols. *Anim Reprod Sci* **105**, 119–128.

16
17 407 Macías García B, Morrel JM, Ortega-Ferrusola C, González-Fernández L,
18
19 408 Tapia JA, Rodríguez-Martínez H, Peña FJ, 2009: Centrifugation on a single layer of
20
21 409 colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen.
22
23 410 *Anim Reprod Sci* **114**, 193-202.

24
25 411 Macías García B; González-Fernández L; Gallardo-Bolaños JM; Peña FJ;
26
27 412 Johannisson A; Morrell JM, 2012: Androcoll-E large selects a subset of live
28
29 413 stallion spermatozoa capable of producing ROS. *Anim. Reprod. Sci.* **132**, 74–82.

30
31 414 Mancill SS, Love CC, Brinsko SP, Edmond AJ, Foster ML, Teague JA, 2010:
32
33 415 Effect of density gradient centrifugation on cryopreservation of equine
34
35 416 spermatozoa. *Anim Reprod Sci Suppl* **121**, 208-209.

36
37 417 Martin JC, Klug E, Guñzel AR, 1979: Centrifugation of stallion semen and its
38
39 418 storage in large volume straws. *J Reprod Fertil Suppl* **27**, 47-51.

40
41 419 Melo CM, Zahn FS, Martin I, Orlandi JA, Dell'Aqua Jr JA, Alvarenga MA,
42
43 420 Papa, FO, 2007: Influence of semen storage and crioprotectant on post-thaw
44
45 421 viability and fertility of stallion. *J Eq Vet Sci* **27**(4), 171-175.

46
47 422 Morrell JM, Johannisson A, Dalin A-M, Rodriguez-Martínez H, 2009:
48
49 423 Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 424 gradient and single layer centrifugation through silica colloids. *Reprod Dom Anim*
4
5 425 **44**, 512-517.

6
7 426 Morrell, 2012: Stallion Sperm Selection: Past, Present, and Future Trends. *J.*
8
9 427 *Equine Vet. Sci.* **32**, 436-440.

10
11 428 Pérez-Sánchez F, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E, 1994: Improvement in
12
13 429 quality of cryopreserved human spermatozoa by swim-up before freezing. *Int J*
14
15 430 *Androl* **17**, 115-120.

16
17 431 Sharma RK, Agarwal A, 1996: Sperm quality improvement in cryopreserved
18
19 432 human semen. *J Urol* **156**, 1008-1012.

20
21 433 Silva SS, Henry M, Nunes SA, Mello SLV, 1997: Effect of packaging on the
22
23 434 quality of frozen donkey seme, evaluated in vitro after thawing. *Rev Bras Reprod*
24
25 435 *Anim* **21**(3), 140-146.

26
27 436 Varner DD, Love CC, Brinsko SP, Blanchard TL, Bliss S, Carroll S, Eslick M.,
28
29 437 2008: Semen Processing for the Subfertile Stallion. *J Equine Vet Sci* **28**(11), 677-
30
31 438 685.

32
33 439

34
35 440

36
37 441

38
39 442

40
41 443

42
43 444

44
45 445

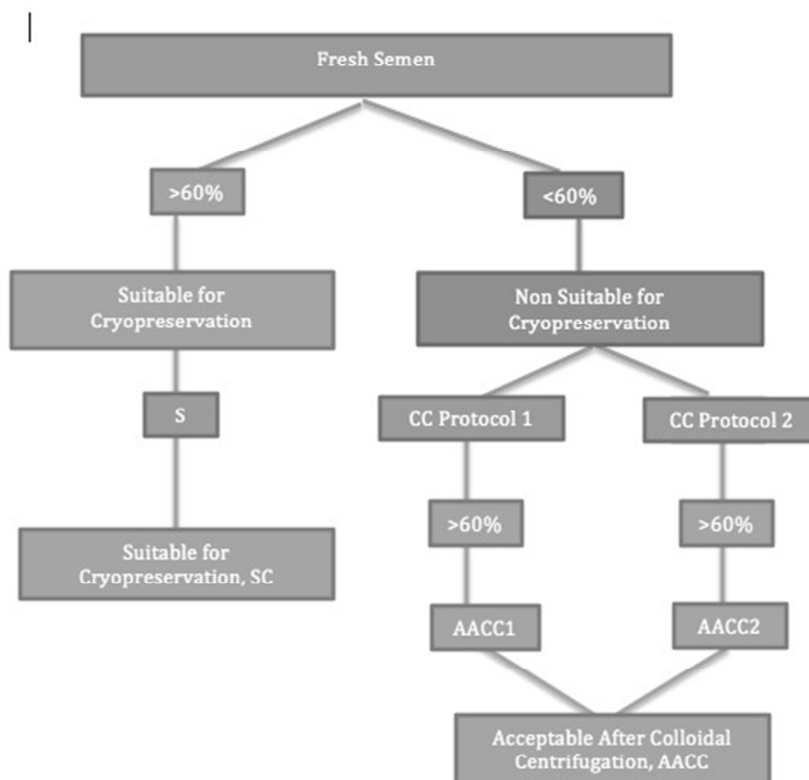
46
47 446

48
49 447

50
51 448

449 List of figures and tables

450 Figure 1: Semen Centrifugation protocols



451

452 S: Simple Centrifugation; CC: Colloidal Centrifugation (Protocol 1 and Protocol 2).

453 SC: Suitable for Cryopreservation; AACC: Acceptable After Colloidal

454 Centrifugation; AACC1: Acceptable After Colloidal Centrifugation with Protocol

455 1; AACC2: Acceptable After Colloidal Centrifugation with Protocol 2.

456

457 Table 1. Progressive motility values for fresh semen and after centrifugation

458 protocols

STALLION	EJACULATE	GROUP	FRESH	AFTER CENTRIFUGATION PROTOCOLS		
				S	PROTOCOL 1 CC	PROTOCOL 2 CC
A	1	SC	76,9	67	-	-

A	2	SC	70,8	59,2	-	-
A	3	SC	68,4	67,9	-	-
B	1	SC	69	69,4	-	-
B	2	NP	44,6	-	33,1	42,6
B	3	NP	42,1	-	49,2	50,7
C	1	SC	67,2	59,3	-	-
C	2	NP	38,1	-	12,4	24,7
C	3	AACC1-2	56,4	-	<u>75,7</u>	<u>58,4</u>
D	1	AACC1	41,9	-	<u>65,4</u>	53,6
D	2	AACC1	41,9	-	<u>65,4</u>	53,6
E	1	AACC2	56,5	-	54,3	<u>66,8</u>
E	2	NP	49,6	-	49	48,5
E	3	NP	49,7	-	41,8	32
F	1	SC	71,2	52,3	-	-
F	2	AACC1	46,3	-	<u>61,8</u>	49,8
F	3	AACC1-2	52,1	-	<u>60,8</u>	<u>64,3</u>

459 Progressive motility values for horses (A-F) in fresh semen (FRESH) and After
 460 Centrifugation: simple (S [10ml extended semen], 1:1, v:v with INRA96®) or
 461 colloidal (PROTOCOL 1 CC [10ml extended semen, 1:1, v:v with INRA96®, over
 462 10ml bottom layer®] and PROTOCOL 2 CC [5ml raw semen over 5ml bottom
 463 layer®]). Group: Suitable for Cryopreservation (SC), Acceptable after Colloidal
 464 Centrifugation with protocol 1 (AACC1) or protocol 2 (AACC2) or both (AACC1-
 465 2) and Non Processed (NP).

466

467 Table 2. Means values for variables 5 minutes after thawing with significant
 468 differences for the different groups.

GROUP	MOT5	PMOT5	VCL5	VSL5	VAP5	LIN5	STR5	ALH5	BCF5
SC	59,10 ^a	45,59 ^a	84,08 ^a	59,71 ^a	69,02 ^a	71,99 ^b	88,89 ^a	2,58^a	10,53 ^a

AACC1	51,55 ^a	40,29 ^a	76,54 ^a	62,43 ^a	68,93 ^a	81,87^a	90,75 ^a	1,84 ^b	8,51 ^a
AACC2	44,22 ^a	38,51 ^a	81,01 ^a	68,88 ^a	73,39 ^a	84,54^a	93,66 ^a	2,07 ^b	9,21 ^a

469 Means values of percentage of percentage of motile sperm (%; MOT); percentage
 470 of progressively motile sperm (%; PMOT); curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL);
 471 straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL); average path velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP); linearity
 472 (%; LIN); straightness (%; STR); amplitude of lateral displacement (μm ; ALH) and
 473 beatcross-frequency (Hz; BCF), after 5 (5) minutes of incubation. Centrifugation
 474 Protocol: C (Simple centrifugation; 10ml extended semen), 1 (Protocol 1: 10ml
 475 extended semen over 10ml bottom layer®) and 2 (Protocol 2: 5ml raw semen over
 476 5ml bottom layer®). Superscript letters represent significant differences between
 477 treatments ($p < 0.05$) in each variable.

478

479 Table 3. Means values for variables 30 minutes after thawing with significant
 480 differences for the different centrifugation protocols

GROUP	MOT30	PMOT30	VCL30	VSL30	VAP30	LIN30	STR30	ALH30	BCF30
SC	50,28 ^a	36,91 ^a	78,24 ^a	59,79 ^a	66,33 ^a	76,82 ^a	90,37 ^a	2,33 ^a	9,76 ^a
AACC1	41,57 ^a	31,01 ^a	74,79 ^a	60,16 ^a	65,76 ^a	80,75 ^a	91,67 ^a	1,95 ^a	8,71 ^a
AACC2	37,80 ^a	27,42 ^a	69,44 ^a	58,00 ^a	62,23 ^a	83,54 ^a	93,21 ^a	1,83 ^a	8,48 ^a

481 Means values of percentage of percentage of motile sperm (%; MOT); percentage
 482 of progressively motile sperm (%; PMOT); curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL);
 483 straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL); average path velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP); linearity
 484 (%; LIN); straightness (%; STR); amplitude of lateral displacement (μm ; ALH) and
 485 beatcross-frequency (Hz; BCF), after 30 (30) minutes of incubation. Centrifugation
 486 Protocol: C (Simple centrifugation; 10ml extended semen), 1 (Protocol 1: 10ml
 487 extended semen over 10ml bottom layer®) and 2 (Protocol 2: 5ml raw semen over

488 5ml bottom layer®). Superscript letters represent significant differences between
489 treatments ($p < 0.05$) in each variable.

490

491 Table 4. Means values variables 5 minutes after thawing with the different freezing
492 extenders in the Suitable for Cryopreservation group

Extender	MOT5	PMOT5	VCL5	VSL5	VAP5	LIN5	STR5	ALH5	BCF5
Botucurio®	73,48 ^a	61,70^a	93,24^a	66,40^a	72,49 ^a	72,45 ^a	91,60^a	2,76 ^a	11,72^a
InraFreeze®	57,33 ^a	42,17 ^b	71,38 ^b	53,46 ^b	63,88 ^a	75,07 ^a	90,89^a	2,41 ^a	9,99 ^b
Lac-Edta	46,45 ^a	32,90 ^b	87,61^a	59,26 ^{a,b}	70,70 ^a	68,47 ^a	84,20 ^b	2,55 ^a	9,85 ^b

493 Means values of percentage of percentage of motile sperm (%; MOT); percentage
494 of progressively motile sperm (%; PMOT); curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL);
495 straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL); average path velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP); linearity
496 (%; LIN); straightness (%; STR); amplitude of lateral displacement (μm ; ALH) and
497 beatcross-frequency (Hz; BCF), after 5 (5) minutes of incubation. Superscript
498 letters represent significant differences between treatments ($p < 0.05$) in each
499 variable.

500

501 Table 5. Means values variables 30 minutes after thawing with the different
502 freezing extenders in the Suitable for Cryopreservation (SC) group

Extender	MOT30	PMOT30	VCL30	VSL30	VAP30	LIN30	STR30	ALH30	BCF30
Botucurio®	59,27 ^a	46,48^a	85,67^a	64,54^a	69,88^a	75,92 ^a	92,33 ^a	2,59 ^a	10,96^a
InraFreeze®	50,66 ^a	33,65 ^b	65,51 ^b	51,61 ^b	57,73 ^b	75,92 ^a	90,02 ^a	2,16 ^a	9,20 ^b
Lac-Edta	40,92 ^a	30,60 ^b	80,55^a	63,23^a	71,38^a	78,63 ^a	88,75 ^a	2,23 ^a	9,13 ^b

503 Means values of percentage of percentage of motile sperm (%; MOT); percentage
504 of progressively motile sperm (%; PMOT); curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL);
505 straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL); average path velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP); linearity

506 (%; LIN); straightness (%; STR); amplitude of lateral displacement (μm ; ALH) and
 507 beatcross-frequency (Hz; BCF), after 30 (30) minutes of incubation. Superscript
 508 letters represent significant differences between treatments ($p < 0.05$) in each
 509 variable.

510

511 Table 6. Means values for variables 5 minutes after thawing with the different
 512 freezing extenders in the Acceptable After Colloidal Centrifugation (AACC) group

Extender	MOT5	PMOT5	VCL5	VSL5	VAP5	LIN5	STR5	ALH5	BCF5
Botucurio®	64,14^a	55,69^a	79,62 ^a	66,31 ^a	70,94 ^a	83,00^a	93,34^a	1,96 ^a	9,26 ^a
InraFreeze®	43,59 ^b	34,43 ^b	71,90 ^a	62,39 ^a	66,11 ^a	86,61^a	94,16^a	1,90 ^a	8,54 ^a
Lac-Edta	38,30 ^b	27,11 ^b	82,54 ^a	64,27 ^a	73,53 ^a	77,56 ^b	87,43 ^b	1,94 ^a	8,63 ^a

513 Means values of percentage of percentage of motile sperm (%; MOT); percentage
 514 of progressively motile sperm (%; PMOT); curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL);
 515 straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL); average path velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP); linearity
 516 (%; LIN); straightness (%; STR); amplitude of lateral displacement (μm ; ALH) and
 517 beatcross-frequency (Hz; BCF), after 5 (5) minutes of incubation. Superscript
 518 letters represent significant differences between treatments ($p < 0.05$) in each
 519 variable.

520

521 Table 7. Means values for variables 30 minutes after thawing with the different
 522 freezing extenders in the Acceptable After Colloidal Centrifugation (AACC) group

Extender	MOT30	PMOT30	VCL30	VSL30	VAP30	LIN30	STR30	ALH30	BCF30
Botucurio®	54,03^a	42,03^a	72,93 ^a	61,63 ^a	65,95 ^a	84,35 ^a	93,43 ^a	1,80 ^a	8,46 ^a
InraFreeze®	35,86 ^b	23,49 ^b	65,76 ^a	54,01 ^a	57,18 ^a	82,03 ^a	94,23 ^a	1,85 ^a	9,00 ^a
Lac-Edta	29,80 ^b	22,19 ^b	79,95 ^a	61,79 ^a	69,81 ^a	78,01 ^a	88,70 ^a	2,11 ^a	8,44 ^a

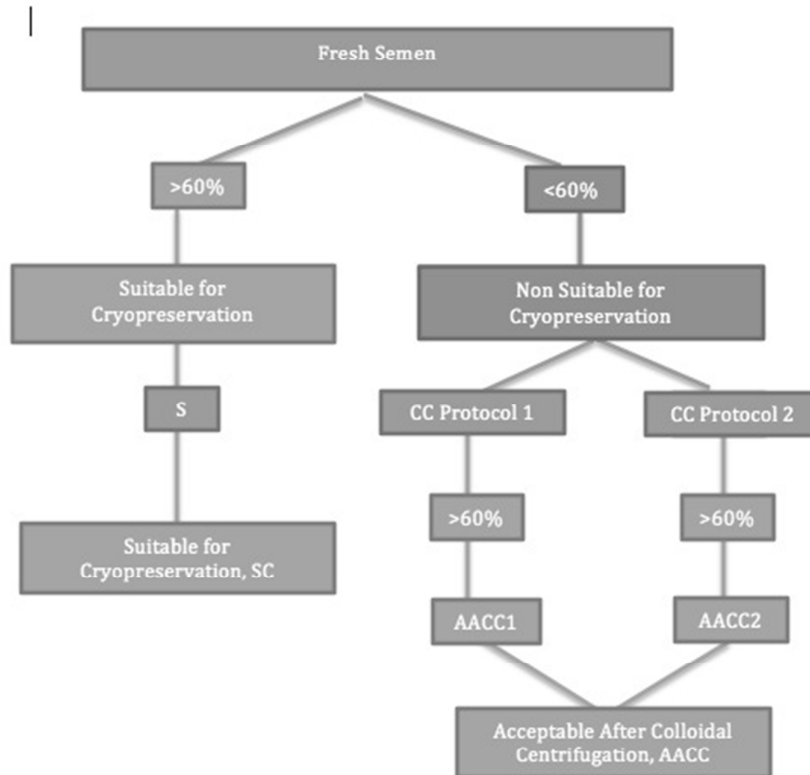
1
2
3 523

4
5 524 Means values of percentage of motile sperm (%; MOT); percentage
6
7 525 of progressively motile sperm (%; PMOT); curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL);
8
9
10 526 straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL); average path velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP); linearity
11
12 527 (%; LIN); straightness (%; STR); amplitude of lateral displacement (μm ; ALH) and
13
14 528 beatcross-frequency (Hz; BCF), after 30 (30) minutes of incubation. Superscript
15
16 529 letters represent significant differences between treatments ($p<0.05$) in each
17
18 530 variable.

19
20
21 531

22
23 532 **Author's address (for correspondence):** L Gutiérrez-Cepeda Departamento de
24
25 533 Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de
26
27 534 Madrid. Avda. Puerta de Hierro, sn, 28040. Madrid, Spain. Email:
28
29
30 535 luna.gutierrez@vet.ucm.es
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1: Semen Centrifugation protocols



S: Simple Centrifugation; CC: Colloidal Centrifugation (Protocol 1 and Protocol 2). SC: Suitable for Cryopreservation; AACC: Acceptable After Colloidal Centrifugation; AACC1: Acceptable After Colloidal Centrifugation with Protocol 1; AACC2: Acceptable After Colloidal Centrifugation with Protocol 2.

Table 1. Progressive motility values for fresh semen and after centrifugation protocols

STALLION	EJACULATE	GROUP	FRESH	AFTER CENTRIFUGATION PROTOCOLS		
				S	PROTOCOL 1 CC	PROTOCOL 2 CC
A	1	SC	76,9	67	-	-
A	2	SC	70,8	59,2	-	-
A	3	SC	68,4	67,9	-	-
B	1	SC	69	69,4	-	-
B	2	NP	44,6	-	33,1	42,6
B	3	NP	42,1	-	49,2	50,7
C	1	SC	67,2	59,3	-	-
C	2	NP	38,1	-	12,4	24,7
C	3	AACC1-2	56,4	-	<u>75,7</u>	<u>58,4</u>
D	1	AACC1	41,9	-	<u>65,4</u>	53,6
D	2	AACC1	41,9	-	<u>65,4</u>	53,6
E	1	AACC2	56,5	-	54,3	<u>66,8</u>
E	2	NP	49,6	-	49	48,5
E	3	NP	49,7	-	41,8	32
F	1	SC	71,2	52,3	-	-
F	2	AACC1	46,3	-	<u>61,8</u>	49,8
F	3	AACC1-2	52,1	-	<u>60,8</u>	<u>64,3</u>

Progressive motility values for horses (A-F) in fresh semen (FRESH) and After Centrifugation: simple (S [10ml extended semen], 1:1, v:v with INRA96®) or colloidal (PROTOCOL 1 CC [10ml extended semen, 1:1, v:v with INRA96®, over 10ml bottom layer®] and PROTOCOL 2 CC [5ml raw semen over 5ml bottom layer®]). Group: Suitable for Cryopreservation (SC), Acceptable after Colloidal Centrifugation with protocol 1 (AACC1) or protocol 2 (AACC2) or both (AACC1-2) and Non Processed (NP).

Table 2. Means values for variables 5 minutes after thawing with significant differences for the different groups.

GROUP	MOT5	PMOT5	VCL5	VSL5	VAP5	LIN5	STR5	ALH5	BCF5
SC	59,10 ^a	45,59 ^a	84,08 ^a	59,71 ^a	69,02 ^a	71,99 ^b	88,89 ^a	2,58^a	10,53 ^a
AACC1	51,55 ^a	40,29 ^a	76,54 ^a	62,43 ^a	68,93 ^a	81,87^a	90,75 ^a	1,84 ^b	8,51 ^a
AACC2	44,22 ^a	38,51 ^a	81,01 ^a	68,88 ^a	73,39 ^a	84,54^a	93,66 ^a	2,07 ^b	9,21 ^a

Means values of percentage of motile sperm (%; MOT); percentage of progressively motile sperm (%; PMOT); curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL); straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL); average path velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP); linearity (%; LIN); straightness (%; STR); amplitude of lateral displacement (μm ; ALH) and beatcross-frequency (Hz; BCF), after 5 (5) minutes of incubation. Centrifugation Protocol: C (Simple centrifugation; 10ml extended semen), 1 (Protocol 1: 10ml extended semen over 10ml bottom layer®) and 2 (Protocol 2: 5ml raw semen over 5ml bottom layer®). Superscript letters represent significant differences between treatments ($p < 0.05$) in each variable.

Table 3. Means values for variables 30 minutes after thawing with significant differences for the different centrifugation protocols

GROUP	MOT30	PMOT30	VCL30	VSL30	VAP30	LIN30	STR30	ALH30	BCF30
SC	50,28 ^a	36,91 ^a	78,24 ^a	59,79 ^a	66,33 ^a	76,82 ^a	90,37 ^a	2,33 ^a	9,76 ^a
AACC1	41,57 ^a	31,01 ^a	74,79 ^a	60,16 ^a	65,76 ^a	80,75 ^a	91,67 ^a	1,95 ^a	8,71 ^a
AACC2	37,80 ^a	27,42 ^a	69,44 ^a	58,00 ^a	62,23 ^a	83,54 ^a	93,21 ^a	1,83 ^a	8,48 ^a

Means values of percentage of motile sperm (%; MOT); percentage of progressively motile sperm (%; PMOT); curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL); straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL); average path velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP); linearity (%; LIN); straightness (%; STR); amplitude of lateral displacement (μm ; ALH) and beatcross-frequency (Hz; BCF), after 30 (30) minutes of incubation. Centrifugation Protocol: C (Simple centrifugation; 10ml extended semen), 1 (Protocol 1: 10ml extended semen over 10ml bottom layer®) and 2 (Protocol 2: 5ml raw semen over 5ml bottom layer®). Superscript letters represent significant differences between treatments ($p < 0.05$) in each variable.

Table 4. Means values variables 5 minutes after thawing with the different freezing extenders in the Suitable for Cryopreservation group

Extender	MOT5	PMOT5	VCL5	VSL5	VAP5	LIN5	STR5	ALH5	BCF5
Botucurio®	73,48 ^a	61,70^a	93,24^a	66,40^a	72,49 ^a	72,45 ^a	91,60^a	2,76 ^a	11,72^a
InraFreeze®	57,33 ^a	42,17 ^b	71,38 ^b	53,46 ^b	63,88 ^a	75,07 ^a	90,89^a	2,41 ^a	9,99 ^b
Lac-Edta	46,45 ^a	32,90 ^b	87,61^a	59,26 ^{a,b}	70,70 ^a	68,47 ^a	84,20 ^b	2,55 ^a	9,85 ^b

Means values of percentage of motile sperm (%; MOT); percentage of progressively motile sperm (%; PMOT); curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL); straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL); average path velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP); linearity (%; LIN); straightness (%; STR); amplitude of lateral displacement (μm ; ALH) and beatcross-frequency (Hz; BCF), after 5 (5) minutes of incubation. Superscript letters represent significant differences between treatments ($p < 0.05$) in each variable.

Table 5. Means values variables 30 minutes after thawing with the different freezing extenders in the Suitable for Cryopreservation (SC) group

Extender	MOT30	PMOT30	VCL30	VSL30	VAP30	LIN30	STR30	ALH30	BCF30
Botucurio®	59,27 ^a	46,48^a	85,67^a	64,54^a	69,88^a	75,92 ^a	92,33 ^a	2,59 ^a	10,96^a
InraFreeze®	50,66 ^a	33,65 ^b	65,51 ^b	51,61 ^b	57,73 ^b	75,92 ^a	90,02 ^a	2,16 ^a	9,20 ^b
Lac-Edta	40,92 ^a	30,60 ^b	80,55^a	63,23^a	71,38^a	78,63 ^a	88,75 ^a	2,23 ^a	9,13 ^b

Means values of percentage of motile sperm (%; MOT); percentage of progressively motile sperm (%; PMOT); curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL); straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL); average path velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP); linearity (%; LIN); straightness (%; STR); amplitude of lateral displacement (μm ; ALH) and beatcross-frequency (Hz; BCF), after 30 (30) minutes of incubation. Superscript letters represent significant differences between treatments ($p < 0.05$) in each variable.

Table 6. Means values for variables 5 minutes after thawing with the different freezing extenders in the Acceptable After Colloidal Centrifugation (AACC) group

Extender	MOT5	PMOT5	VCL5	VSL5	VAP5	LIN5	STR5	ALH5	BCF5
Botucurio®	64,14^a	55,69^a	79,62 ^a	66,31 ^a	70,94 ^a	83,00^a	93,34^a	1,96 ^a	9,26 ^a
InraFreeze®	43,59 ^b	34,43 ^b	71,90 ^a	62,39 ^a	66,11 ^a	86,61^a	94,16^a	1,90 ^a	8,54 ^a
Lac-Edta	38,30 ^b	27,11 ^b	82,54 ^a	64,27 ^a	73,53 ^a	77,56 ^b	87,43 ^b	1,94 ^a	8,63 ^a

Means values of percentage of motile sperm (%; MOT); percentage of progressively motile sperm (%; PMOT); curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL); straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL); average path velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP); linearity (%; LIN); straightness (%; STR); amplitude of lateral displacement (μm ; ALH) and beatcross-frequency (Hz; BCF), after 5 (5) minutes of incubation. Superscript letters represent significant differences between treatments ($p < 0.05$) in each variable.

Table 7. Means values for variables 30 minutes after thawing with the different freezing extenders in the Acceptable After Colloidal Centrifugation (AACC) group

Extender	MOT30	PMOT30	VCL30	VSL30	VAP30	LIN30	STR30	ALH30	BCF30
									0
Botucurio®	54,03^a	42,03^a	72,93 ^a	61,63 ^a	65,95 ^a	84,35 ^a	93,43 ^a	1,80 ^a	8,46 ^a
InraFreeze®	35,86 ^b	23,49 ^b	65,76 ^a	54,01 ^a	57,18 ^a	82,03 ^a	94,23 ^a	1,85 ^a	9,00 ^a
Lac-Edta	29,80 ^b	22,19 ^b	79,95 ^a	61,79 ^a	69,81 ^a	78,01 ^a	88,70 ^a	2,11 ^a	8,44 ^a

Means values of percentage of motile sperm (%; MOT); percentage of progressively motile sperm (%; PMOT); curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$; VCL); straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$; VSL); average path velocity ($\mu\text{m/s}$; VAP); linearity (%; LIN); straightness (%; STR); amplitude of lateral displacement (μm ; ALH) and beatcross-frequency (Hz; BCF), after 30 (30) minutes of incubation. Superscript letters represent significant differences between treatments ($p < 0.05$) in each variable.

CAPÍTULO 8: DISCUSIÓN

1. Artículo 1: “Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure”

En nuestro primer experimento (**Artículo 1**) estudiamos la adaptación clínica de un producto de centrifugación coloidal (CC) (Equipure®) a través de la comparación del protocolo propuesto por el fabricante con otros cinco protocolos de aplicación clínica más sencilla. Pudimos constatar que la calidad seminal de las muestras obtenidas tras los diferentes protocolos de CC propuestos no disminuían con respecto a la calidad del protocolo comercial sugerido por el fabricante. Ello determina la posibilidad de aplicar protocolos de una sola capa y con grandes volúmenes de semen (puro o diluido) sin que se vea afectada negativamente la efectividad de la técnica.

Otros autores han llegado a conclusiones similares a las nuestras, determinando que los protocolos de CC de una sola capa son, al menos, tan buenos como los de gradientes de densidad para varias especies en cuanto a su capacidad selectiva y parámetros seminales obtenidos (Morrell y col., 2008a, 2008b, 2009a, 2009b, 2009c; Thys y col., 2009; Edmond y col., 2012). La posibilidad de utilizar métodos de CC de una sola capa junto al procesado de grandes volúmenes de semen que permiten el procesado rápido del eyaculado completo, resulta muy atractiva y deseada puesto que facilita y simplifica la técnica a la vez que disminuye los costes y el tiempo empleado (Morrell y col., 2009c).

En cuanto al incremento de la calidad seminal sobre la muestra inicial (VT-VC) observamos que todos los tratamientos incrementaron tanto el índice de rectitud (STR) como la frecuencia de batida (BCF). El índice de linearidad (LIN) fue significativamente mayor en los protocolos de CC con semen diluido versus las muestras control. La tendencia a presentar mejores valores en los tratamientos que utilizaban semen diluido se observó, en general, en todas las variables aunque sin diferencias entre ellos. LIN y STR son medidas de progresividad y BCF medidas de vigor espermático (Cancel y col., 2000).

En cuanto a la integridad de la cromatina medida a tiempo 0 tras el procesado, se observó mayor integridad de la cromatina en los protocolos 2, 4, 5 y 6. Estos resultados son similares a los reportados por otros autores que también han descrito menores valores de sDFI en las muestras espermáticas sometidas a selección mediante CC respecto a las no seleccionadas (Macpherson y col, 2002; Edmond, 2009; Johannisson y col., 2009; Morrell y col., 2009a, 2009b, 2009c, 2012). La relación existente entre la integridad de la cromatina espermática y la fertilidad (Love y Kenney, 1994; López-Fernández y col., 2007; Morrell y col., 2009e) y la capacidad de la CC para seleccionar espermatozoides con cromatina intacta y madura, de mayor densidad que la inmadura o dañada (Johannisson y col., 2009; Morrell y col., 2009b), ha hecho que se referencie como una técnica efectiva para maximizar la fertilidad de los sementales (Macpherson y col., 2002; Brinsko, 2006; Geraghty, 2006; Loomis, 2006; Edmond y col., 2008; Morrell y col., 2008a; Varner y col., 2008; Johannisson y col., 2009; Morrell y col., 2009d, 2009e; Mari y col., 2011).

La CC ha sido descrita por otros autores como una técnica útil para seleccionar espermatozoides móviles, con morfología normal y cromatina espermática intacta, además de eliminar las células inflamatorias y espermatozoides muertos o dañados presentes, que podrían ser responsables de un efecto dañino sobre los espermatozoides viables (Johannisson y col., 2009; Ortega-Ferrusola y col., 2009) y eliminar así mismo agentes patógenos (Geraghty, 2006; Morrell y Geraghty, 2006; Johannisson y col., 2009; Ortega-Ferrusola y col., 2009).

Atendiendo a los protocolos de CC que proponía el fabricante y al volumen de semen que presentan generalmente los sementales (60 a 100 ml de media), la incorporación de esta técnica al procesamiento de semen equino determinaba el uso de unos 40 tubos de centrifugación (de 50 ml) y el incremento en un 100% el costo de la congelación del semen, lo que resultaba inviable desde el punto de vista clínico.

En los protocolos tradicionales de dos capas, para conseguir una adecuada selección espermática, es muy importante no romper la interfase entre los gradientes de distinta densidad. Para ello se deben colocar muy despacio uno encima de otro y, aunque con mucha dificultad, poder observarla visualmente.

Otro momento crítico es la deposición del semen encima del gradiente y, aunque es más fácil de visualizar, es igual de difícil conseguir una separación limpia entre semen y coloide. Por todo ello, el uso de una sola capa de coloide disminuye los factores externos que pueden interferir a la hora de conseguir una buena muestra de espermatozoides seleccionados.

Nuestros resultados indican que los protocolos diseñados en nuestro laboratorio son útiles para obtener muestras espermáticas de mayor calidad, pudiendo centrifugar en una sola capa del coloide y con un mayor volumen de semen, sin perder calidad de la muestra obtenida. Este hecho supone un gran avance desde el punto de vista económico y técnico.

2. Artículo 2: “Colloidal centrifugation of stallion semen results in a reduced rate of sperm DNA fragmentation”

En el segundo trabajo (**Artículo 2**) comparamos la CC con la centrifugación simple (CS) en semen fresco, a través del estudio de las características seminales del semen no centrifugado (NC) y de los pellets resultantes de las centrifugaciones.

Pudimos constatar que no existieron diferencias significativas a tiempo 0 en la motilidad progresiva (MP) entre tratamientos. Como en el trabajo previamente descrito (Artículo 1), en el que tampoco encontramos diferencias significativas en la MP entre la muestra no centrifugada y la muestra procesada con CC.

Del mismo modo, no existieron diferencias significativas a tiempo 0 en el valor de la integridad de la cromatina espermática entre tratamientos. Estos resultados se contraponen con los encontrados por otros autores quienes reportan menores índices de fragmentación del ADN espermático en las muestras espermáticas que habían sido sometidas a selección mediante CC respecto a las no seleccionadas (Macpherson y col, 2002; Edmond, 2009; Johannisson y col., 2009; Morrell y col., 2009a, 2009b, 2009c, 2012), y con los de Love y colaboradores (2005) quienes determinaron que la CS tenía un efecto negativo sobre la integridad del ADN espermático visible nada más procesarlo.

Por el contrario, Hoogewijs y colaboradores (2010) han determinado que la CS de semen equino no afecta negativamente al daño sobre la cromatina espermática, incluso tras 4 días de almacenamiento en refrigeración.

En relación a la dinámica de la fragmentación de la cromatina, sin embargo, sí encontramos mejores valores en las muestras procesadas mediante CC que en las muestras NC y que en las procesadas mediante CS.

En ninguno de los estudios anteriormente citados realizaron una evaluación dinámica de la fragmentación del ADN espermático, que es considerada por ciertos autores muy importante ya que durante la incubación hay una tendencia a que se incremente el daño en las moléculas de ADN (López-Fernández y col., 2007; Cortés-Gutiérrez y col., 2008), al permitirse la expresión del daño latente de la cromatina espermática que no es visible inmediatamente tras la eyaculación, la criopreservación o el procesado (Gosálvez y col., 2011a, 2011b). Hay evidencias crecientes de que la integridad de la cromatina espermática en el momento de la fertilización influye en la supervivencia embrionaria (López-Fernández y col., 2007), de modo que una integridad del ADN espermático pobre puede desencadenar o ser responsable de parte de la infertilidad tradicionalmente asociada a la hembra. Por ello, la evaluación única de los valores basales de SDFI puede resultar en una falsa evaluación positiva de la calidad del ADN.

Para realizar esta evaluación dinámica, tomamos medidas de los valores SDFI a tiempo 0, 4, 6 y 24 horas de incubación para calcular la tasa de fragmentación del ADN espermático (r-SDF) como el incremento en la pérdida de calidad del ADN durante este periodo de incubación. La tasa de fragmentación del ADN fue menor en el protocolo de CC respecto a la CS y a la no centrifugación. Al observar la dinámica del ADN espermático resultó posible evaluar la subpoblación

espermática con ADN dañado que se había eliminado con la CC pero que a tiempo 0 aún no había podido expresarse. La evaluación dinámica del sDFI es una herramienta más sensible de diagnóstico del daño del DNA leve y representa una herramienta poderosa para el refinamiento de las tecnologías de reproducción asistida.

La eliminación del plasma seminal mediante CS es uno de los procedimientos para mejorar la viabilidad del semen en la clínica equina (Aurich, 2008; Ferrer y col., 2012), concentrando espermatozoides normales, anormales y no viables en el “pellet” (Sieme y col., 2003; Johannisson y col., 2009; Ferrer y col., 2012). En humana las técnicas de selección espermática se recomiendan porque se evita la CS en la que todos los espermatozoides permanecen en la población final, lo que incrementa la producción de EROs en el pellet provocando un efecto negativo sobre la función espermática y fallos de fertilización (Sieme y col., 2003; Thomson y col., 2009; Jayaraman y col., 2012). Al retirarse espermatozoides no viables o dañados y leucocitos mediante CC se disminuye la formación de EROs, reduciendo el daño que sufren los espermatozoides vivos, manteniéndose la integridad de la cromatina espermática e incrementándose la viabilidad espermática (Johannisson y col., 2009; Macías y col., 2009a; Morrell y col., 2009a, 2009b, 2009d; López-Fernández y col., 2010).

Nuestro equipo investigador ha realizado otros trabajos estudiando la CC y la CS a través la comparación de los sobrenadantes y pellets obtenidos tras cada técnica (Gutiérrez-Cepeda y col., 2011), observando que en ambos protocolos de centrifugación se obtenían índices sDFI en el pellet significativamente menores respecto al sobrenadante a tiempo 0, y durante el resto de tiempos en la evaluación dinámica de la fragmentación del ADN. Estos resultados indicaban que la calidad seminal de los espermatozoides en el pellet era mayor que en el sobrenadante y que ambos sistemas seleccionaron espermatozoides de buena calidad. Sin embargo, la selección mediante CC dejaba en el sobrenadante espermatozoides de calidad más comprometida que con la CS, teniendo una capacidad selectiva mejor, que permitía que el mantenimiento en el tiempo de almacenamiento de determinadas variables, como es el caso de la sDFI a las 24 horas de incubación, fuera significativamente menor que con la CS.

3. Artículo 3: “The effect of two pre-cryopreservation single layer colloidal centrifugation protocols in combination with different freezing extenders on the fragmentation dynamics of thawed equine sperm DNA”

En este trabajo comparamos el efecto de la CS y CC aplicadas antes de la criopreservación sobre la dinámica de fragmentación del ADN espermático equino.

La recuperación espermática tras la CS fue mayor (98,5%) que la que aparece generalmente en la literatura, donde se estiman pérdidas medias de entre el 20-25% (Pickett y Amann, 1993; Morrell y col., 2009b; Ferrer y col., 2012), aunque hay autores que han reportado recuperaciones similares a la nuestra (Weiss y col., 2004). En el caso de la CC nuestra tasa media de recuperación espermática (57,79%) fue similar a la publicada por Hoogewijs y col. (2011) (50,9%).

La CC se ha asociado a menores tasas de recuperación que los métodos de centrifugación que no seleccionan espermatozoides (Hoogewijs y col., 2011), como es nuestro caso, en los que la recuperación espermática en la CC fue aproximadamente la mitad que en la CS (57,79% vs 98,5% respectivamente).

La recuperación espermática en el pellet tras la CC está relacionada negativamente con la concentración espermática depositada sobre el coloide (Edmond y col., 2012; Morrell y col., 2012) y varía según la calidad del eyaculado original (Morrell y col., 2010c, 2011a, 2012; Edmond y col., 2012).

En este sentido Hoogewijs y colaboradores (2011) obtuvieron un menor rendimiento de la CC en aquellos sementales clasificados como “No adecuados para la congelación” respecto a los clasificados como “Adecuados para la congelación”.

Se ha especulado con que la tasa de recuperación espermática tras la CC podría usarse como indicador potencial de fertilidad en sementales sin historia reproductiva previa (Morrell y col., 2011a).

A diferencia de los resultados obtenidos en el **Artículo 2**, en este caso sí obtuvimos menores índices de fragmentación de la cromatina espermática a tiempo 0 (nada más descongelar) con el protocolo de CC que con el protocolo de CS. Estos datos son consistentes con los de otros autores tanto para semen humano (Sakkas y col., 2000; Tomlinson y col., 2001; Brahem y col., 2011; Jayaraman y col., 2012), como semen equino en fresco (Macpherson y col., 2002; Edmond, 2009; Johannisson y col., 2009; Morrell y col., 2009a, 2009b, 2009c, 2012), refrigerado (Morrell y col., 2009e) y procesado con CC antes de la congelación (Macías García y col., 2009a; Mancill y col., 2010; Hoogewijs y col., 2011) o procesado con CC tras descongelar (Macías García y col., 2009a, 2009b; Mancill y col., 2010). Y se contraponen al estudio de García-Álvarez y colaboradores (2010) quienes al aplicar la CC en muestras de semen de ratón descongelados obtuvieron mayores índices SDFI respecto a las no seleccionadas.

Los resultados de sDFI inmediatamente tras descongelar en los protocolos de CC fueron entre (6.55-22.46%), valores similares a los reportados por otros autores (López-Fernández y col., 2007) (4.2-26.3%).

Los valores sDFI aumentaron con la incubación a 37°C en todos tratamientos considerados, como han encontrado otros autores (López-Fernández y col., 2007) y al igual que en nuestros anteriores estudios (Artículo 2). Sin embargo, en nuestro caso el mayor incremento ocurrió entre las 6 y 24h de incubación, y no entre las 1 y las 6h como describieron López-Fernández y colaboradores (2007). Tras 4 horas de incubación a 37°C el Protocolo 2 (CC con semen sin diluir) causó valores significativamente menores de sDFI respecto a la CS. A las 6 y 24h de incubación los valores del Protocolo 2 tendieron a ser menores, aunque no se determinaron diferencias significativas. En general, el daño en el ADN ocurrió más rápido y de forma más intensa tras la CS.

Luego, en las muestras de semen sometidas a CC tanto en semen fresco (Artículos 2) como previamente a su congelación (Artículo 3) los índices de sDFI tras la incubación a 37°C fueron menores, lo que podría estar relacionado con la mayor longevidad del semen seleccionado. Las dinámicas de fragmentación del ADN lentas parecen estar asociadas con mayor viabilidad del semen en el tracto genital de la hembra (López-Fernández y col., 2007 y Cortés-Gutiérrez y col., 2008).

En cuanto a los valores medios de sDFI postdescongelación en relación a los diluyentes, observamos que nuestros resultados en muestras seleccionadas mediante CC y criopreservadas con el diluyente de congelación Botucurio®, son del 13.24% para B-1 y 11.86% para B-2 (técnica SCD), estos datos concuerdan con los de Hoogewijs y colaboradores (2011) que obtuvieron valores medios de sDFI postdescongelación del 12% aproximadamente, (técnica SCSA) y los valores de las muestras criopreservadas con Gent® y no seleccionadas (17.1% para G-C) también son similares a los de Cortés-Gutiérrez y colaboradores (2009) con valores de entre el 18-22% (técnica N-Comet Assay) en muestras de semen criopreservadas y no seleccionadas.

Independientemente del protocolo de centrifugación utilizado el diluyente de congelación InraFreeze® redujo significativamente los valores de sDFI a tiempo 6 versus el diluyente Botucrio® y a tiempo 24h de incubación tanto respecto al diluyente Botucrio® como al Gent®. Estos resultados se contraponen con el estudio realizado en semen criopreservado humano y seleccionado por centrifugación coloidal por Thomsom y colaboradores (2009) quienes no encontraron diferencias entre los diferentes diluyentes utilizados sobre la integridad de la cromatina espermática. Algunos autores han determinado que los diluyentes a base de yema de huevo protegen mejor la estructura de la cromatina espermática respecto a los diluyentes a base de leche desnatada, al menos en semen bovino (Karabinus y col., 1999). En contraposición, Carvalho y colaboradores (2008) determinaron que no existía influencia del diluyente utilizado sobre la integridad del ADN. Sin embargo, hay que decir que en estos dos

estudios sólo se realizó la evaluación de la integridad de la cromatina espermática nada más descongelar, sin procederse a la evaluación de su dinámica en incubación a 37°C, que es cuando más se ve afectado este parámetro. El mecanismo exacto por el que la yema de huevo ayuda en la protección de los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación no se conoce (Moussa y col., 2002), pero parece ser que las lipoproteínas de baja densidad presentes en el plasma de la yema de huevo podrían actuar como agentes crioprotectores (Moussa y col., 2002; Pillet y col., 2011). Existen evidencias crecientes de que, así mismo, existen antagonistas crioprotectores en otras fracciones de la yema de huevo (Moussa y col., 2002; Pillet y col., 2011). Esto podría explicar por qué se obtuvieron mejores valores de sDFI con Inrafreeze®, que contiene sólo plasma de yema de huevo y no yema de huevo completa como ocurre en BotuCrio® y Gent®. Reemplazar la yema de huevo por plasma de yema de huevo esterilizada puede ayudar a eliminar la fuente potencial de antagonistas crioprotectores (Pillet y col., 2011). En cualquier caso creemos que se necesitan más estudios para determinar la influencia de los diluyentes de congelación en la dinámica de fragmentación del ADN espermático equino.

4. Artículo 4 “Equine sperm cryopreservation efficiency optimization by colloidal centrifugation”

En el **Artículo 4** estudiamos la incorporación de la CC antes del procesado de criopreservación en condiciones clínicas, valorando su influencia sobre la calidad seminal, tipo de diluyente utilizado y su eficacia dentro de una “Prueba de Congelación”.

De acuerdo a las recomendaciones internacionales, la motilidad progresiva del semen fresco debe ser de al menos el 60% para poder considerar dicho eyaculado “Adecuado para la Congelación” (Samper and Morris, 1998; Loomis and Graham, 2008). En nuestro trabajo investigamos si la aplicación de la CC en los eyaculados que no reunían esta condición podía incrementar el número de eyaculados y/o sementales aceptados para una “Prueba de Congelación”. Realizamos un diseño experimental en el que los eyaculados cuya MP en fresco era $\geq 60\%$ eran clasificados como “Adecuados para la Congelación” (AC) y procesados de forma estándar, este procesado incluye la CS del semen. Los eyaculados cuya MP en fresco era $< 60\%$ se clasificaban como “No Adecuados para la Congelación” (NAC) y se sometían a dos protocolos de CC. Si tras la CC su MP era $\geq 60\%$ se clasificaban como “Aceptados tras CC” (ATCC1 y/o ATCC2) y eran incluidos en la Prueba de Congelación, sino alcanzaban este valor no eran procesados (NP).

Al estudiar la calidad seminal postdescongelación de las muestras con CS y las que habían sido procesadas con CC, sólo encontramos diferencias significativas en las variables LIN y ALH a los cinco minutos de incubación a 37°C tras la

descongelación, lo que demostraba que la calidad seminal postdescongelación de las muestras era similar, independientemente del tipo de procesado al que habían sido sometidas. La herramienta de CC previa a la congelación permite que a partir de eyaculados de mala calidad se obtengan dosis de semen descongelado de calidad similar a la de los eyaculados de buena calidad en fresco.

No se encontraron diferencias significativas en la capacidad selectiva espermática entre los dos protocolos de CC utilizados. Estos resultados concuerdan con los que describimos previamente (Artículo 1). Sin embargo, clínicamente el Protocolo 1 (CC con semen diluido) fue más efectivo, y mejoró cinco de los once eyaculados que no habían sido aceptados para la congelación. Mientras que el Protocolo 2 (CC con semen sin diluir) sólo mejoró tres de esos once.

En la clínica reproductiva humana las técnicas de centrifugación coloidal se llevan usando desde principios de los años 90 para seleccionar muestras espermáticas superiores que toleren mejor los procesos de criopreservación con el objetivo de obtener dosis seminales postdescongelación de calidad superior (Pérez-Sánchez y col., 1994; Sharma y Agarwal, 1996). En équidos, los estudios sobre su efecto en la criopreservación describen que al aplicar la CC sobre muestras descongeladas se ha observado un incremento en la calidad seminal respecto a la no selección de las muestras (Macías y col., 2009a, 2009b; Mancill y col., 2010). Hoogewijs y colaboradores (2011) compararon el efecto de la CC monocapa y el de la técnica cushion aplicados antes de la criopreservación sobre la calidad seminal pre y postdescongelación de muestras de semen equino,

encontrando que la calidad seminal tanto pre como postdescongelación de las muestras seminales era mayor cuando habían sido procesadas con CC. Este incremento fue mayor en los sementales que clasificaron como “No Adecuados para la Congelación”, aquellos que producían dosis seminales postdescongelación <30%MP. En su estudio posterior (Hoogewijs y col., 2012), también observaron una mejora de la calidad postdescongelación cuando se aplicaba la CC antes de la criopreservación en comparación a la técnica cushion. Además, este incremento significativo en la motilidad total e integridad de la membrana en las muestras sometidas a CC se mantuvo durante 120 minutos de incubación a 37°C.

De forma similar, Mancill y colaboradores (2010) compararon la aplicación de la CC previa a la congelación versus los protocolos de congelación estándar con CS en eyaculados de sementales clasificados como fértiles y subfértiles, encontrando que la calidad seminal postdescongelación era significativamente mayor con la CC que con la CS para los sementales subfértiles, aunque ellos no encontraron tales diferencias dentro del grupo de sementales clasificados como fértiles.

Varios autores (Hoogewijs y col., 2011; Macías García y col., 2012b) defienden que la CC selecciona una subpoblación de espermatozoides que responde de manera claramente diferente al shock osmótico, pudiendo tolerar mejor los procedimientos de conservación, probablemente ligado a la menor generación de EROs y a la menor carga de contaminación conseguida tras la CC.

En nuestro caso no procesamos con CC aquellos eyaculados de buena calidad en fresco; como bien indica Mancill y colaboradores (2010) creemos que en estos eyaculados la CC es un paso adicional que supone un coste económico y técnico innecesario. Hoogewijs y colaboradores (2011) también han indicado la importancia de una correcta selección de los sementales antes de incluirlos en los protocolos de congelación con CC. Por ello, al igual que estos autores, consideramos que la incorporación de la CC en eyaculados de baja calidad para los protocolos de criopreservación tiene un gran interés ya que aumenta la eficiencia de la técnica cuando hay que hacer frente a eyaculados de baja calidad en fresco; incrementando el número de eyaculados criopreservables de cada semental y seleccionando espermatozoides de mayor calidad, permitiendo además obtener muestras de semen congelado de caballos que por su calidad seminal serían rechazados para la criopreservación.

En nuestra muestra sólo ocho de los diecisiete eyaculados presentaban MP por encima del 50%, lo que es característico de una raza de baja calidad seminal como es el caballo PRE (Benito y col., 2003). Y sólo seis se consideraron AC ($MP \geq 60\%$). De entre los once eyaculados que no alcanzaban el 60% de MP en fresco (NAC), seis alcanzaron MP suficiente para ser incluidos en la Prueba de Congelación tras la CC (ATCC). Por lo tanto, gracias a la CC antes de la criopreservación, incrementamos del 35% (6/17) al 71% (12/17) el porcentaje de eyaculados disponibles para la congelación, duplicando el número de muestras criopreservadas.

En cuanto a los individuos, de los seis sementales que participaron en el estudio sólo un caballo presentó suficiente motilidad progresiva en fresco en todos sus eyaculados. En el resto (83,3% de los individuos), se necesitó un paso previo de CC para mejorar la calidad seminal de alguno o en todos sus eyaculados.

Atendiendo a los diluyentes utilizados, el diluyente BotuCrio® fue el que optimizó de manera más eficiente todos los parámetros de motilidad y sus características, tanto en las muestras que eran adecuadas para la congelación (AC) como las que fueron aceptadas tras la CC (ATCC), mejorando la MP tanto inmediatamente tras descongelar como tras 30 minutos de incubación a 37°C. En los parámetros de velocidad VCL, VSL y VAP, el Lac-EDTA fue mejor que InraFreeze® pero sólo dentro de las muestras aceptadas para la criopreservación (AC).

Esta superioridad del Botucario® podría estar relacionada con la combinación de crioprotectores presentes en este diluyente de congelación, que incluye una amida, la metilformamida, y una proporción menor de glicerol. InraFreeze® y Lac-Edta, sólo incluyen glicerol como crioprotector. La efectividad de las amidas como agentes crioprotectores en la mejora de la motilidad y viabilidad espermática postdescongelación, así como en la reducción de la variabilidad individual y racial, especialmente en los caballos clasificados como “malos congeladores” ha sido probada por numerosos autores (Ball y Vo, 2001; Gomes y col., 2002; Papa y col., 2002; Vidament y col., 2002; Alvarenga y col., 2003; Rossi y col., 2003; Melo y col., 2007; Barros y col., 2008).

El desarrollo de nuevos diluyentes de congelación y la combinación de estos con técnicas de selección espermática podría ayudar a optimizar la criopreservación seminal equina, especialmente a la hora de enfrentarnos a sementales cuya baja calidad seminal limita su inclusión en programas comerciales de congelación espermática.

5. Variabilidad Individual

En todos nuestros estudios se ha hecho eco el efecto de la variabilidad individual característica de la población equina en todos sus parámetros seminales. Este hecho ha sido descrito por numerosos autores (Samper y Morris, 1998; Aurich, 2008; Loomis y Graham, 2008; Sieme y col., 2008). En nuestro primer estudio (**Artículo 1**) se observa dicho efecto sobre la respuesta de las características seminales al tratamiento. Sin embargo, el efecto positivo sobre la calidad seminal de los métodos de CC fue observado en general en todos los sementales, de modo que en cada caso, con al menos uno de los protocolos de CC se incrementó el número de espermatozoides normales y con motilidad progresiva, y los valores de LIN, STR y sDFI.

Durante el estudio de la incorporación de la CC en los protocolos de congelación (**Artículo 3 y 4**) también quedó reflejado el fenómeno de la variabilidad individual en cuanto a los valores medios de las variables analizadas o al efecto de los protocolos de centrifugación o diluyentes. En este sentido, se observaron diferencias significativas entre sementales en cuanto a los valores medios de sDFI observados (**Artículo 3**), apreciándose dos grupos significativamente diferenciados: un grupo con valores bajos (<20,23%) y otro de valores altos (>27,13%). Este hecho también fue observado por López-Fernández y colaboradores (2007), aunque en su caso el porcentaje de animales cuyos valores sDFI excedían al 20% fue inferior al nuestro (17,4% versus 33% respectivamente). Esta variabilidad en los valores de sDFi también se observó en su dinámica, como ya describieron López-Fernández y colaboradores (2007).

Es probable que esta variabilidad individual tan manifiesta en los sementales respecto a sus características seminales se deba al tipo de selección artificial al que han sido sometidos, ya que los caballos han sido seleccionados por caracteres de pedigrí y rendimiento atlético más que por caracteres reproductivos (Varner y col., 2008; Mari y col., 2011), lo que ha determinado que se utilicen sementales subfértiles de baja calidad seminal en los programas comerciales de inseminación artificial (Colenbrander y col., 2003; López-Fernández y col., 2007; Morrell y col., 2008; Morrell y col., 2009a, 2009b; Mari y col., 2011)

6. Beneficios del Uso de Coloides en la clínica reproductiva equina

Atendiendo a los protocolos de uso de los coloides comerciales y al volumen de semen equino, se hacía inviable desde el punto de vista clínico incorporar la CC en los protocolos de procesado para conservación seminal, debido sobre todo al complejo manejo laboratorial y al incremento del coste económico.

Nuestros resultados indican que los protocolos diseñados en nuestro laboratorio, con mayores volúmenes de semen y CC monocapa, son tan útiles como los protocolos comerciales a la hora de obtener muestras espermáticas de mayor calidad.

Así mismo, se facilita el manejo laboratorial, disminuyendo los factores externos que pueden interferir a la hora de conseguir una buena interfase entre gradientes para obtener una buena muestra de espermatozoides seleccionados.

Hoy en día los protocolos de CC monocapa están integrados en la clínica reproductiva equina y en los estudios de investigación como podemos observar en las numerosas publicaciones de los últimos años (Morrell y col., 2010b, 2011a, 2011b, 2013; Bergqvist y col., 2011; Hoogewijs y col., 2011; Lindahl y col., 2012; Macías García y col., 2012b). También se está incrementando el estudio de su efecto sobre las tasas de fertilidad *in vivo*, y son numerosos los equipos de investigación, entre ellos el nuestro (Ayuso-Hernando y col., 2011), que están determinando el aumento de las tasas de gestación que se consigue con su utilización principalmente en équidos subfértiles (Varner y col., 2008; Morrell y

col., 2010c; Mari y col., 2011; Morrell y col., 2011; Macías García y col., 2012b; Morrell y col., 2012).

Hemos podido constatar así mismo la utilidad de la CC previa a la congelación dentro de los protocolos clínicos, observando como su incorporación en la Prueba de Congelación permite incrementar el número de eyaculados y sementales que pueden ser incluidos en los programas de congelación seminal comerciales. Gracias a la CC antes de la criopreservación, aumentamos el número de sementales aptos para la congelación seminal, duplicamos el porcentaje de eyaculados disponibles en congelación, y por tanto, el número de pajuelas y dosis criopreservadas. Además, hemos constatado que podemos obtener dosis de semen descongelado de calidad similar a la de los eyaculados de buena calidad en fresco a partir de eyaculados de peor calidad.

CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES

De la presente investigación “Optimización de las técnicas de procesamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal” se desprenden las siguientes conclusiones:

- 1. Es posible aplicar protocolos de centrifugación coloidal de una sola capa y con grandes volúmenes de semen sin que se vea afectada negativamente la selección espermática de la centrifugación con gradientes; haciéndola compatible técnica y económicamente en la práctica de la clínica equina.
- 2. La dinámica de la fragmentación del ADN ocurre de forma más lenta y menos intensa tras la centrifugación coloidal respecto al semen fresco no procesado y respecto al semen fresco procesado mediante centrifugación simple.
- 3. La centrifugación coloidal previa a la congelación del semen permite obtener muestras de semen descongelado con mayor integridad del ADN manteniendo en el tiempo un índice de fragmentación menor.
- 4. La evaluación dinámica de la fragmentación del ADN permite la expresión del daño latente en la cromatina espermática, que no siempre es visible inmediatamente tras la eyaculación o el procesado.

- 5. El diluyente de congelación InraFreeze® presenta una dinámica de fragmentación del ADN más lenta que el diluyente BotuCrio® y el Gent®. El diluyente Botucario® mantiene mejores características de la motilidad espermática que el diluyente InraFreeze® y el Lactosa-Edta.

- 6. El caballo de Pura Raza Española puede ser considerado una raza de baja calidad seminal, en relación al alto porcentaje de animales con una motilidad progresiva menor al 50%.

- 7. Al incluir la centrifugación coloidal en una Prueba de Congelación clínica, el protocolo que incorpora 10ml de semen diluido sobre 10ml del coloide fue más efectivo que el protocolo que incluye 5ml de semen puro sobre 5ml del coloide.

- 8. La centrifugación coloidal permite obtener, a partir de eyaculados de peor calidad, dosis de semen descongelado de calidad similar a la de los eyaculados de buena calidad.

- 9. La incorporación de la centrifugación coloidal en la Prueba de Congelación incrementa el número de sementales y/o eyaculados adecuados para los programas de congelación comerciales, optimizando la técnica.

CAPÍTULO 10: ABREVIATURAS

AC	Adecuados para la Congelación
ADN	Ácido Dexosirribonucleico
ALH	Amplitud de Desplazamiento Lateral de la Cabeza
ATCC	Aceptados Tras la Centrifugación Coloidal
BCF	Frecuencia de Batida
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
CC	Centrifugación Coloidal
CS	Centrifugación Simple
CRISP	Proteínas Secretoras Ricas en Cisteína
DBD-FISH	DNA breakage detection-FISH
sDFI	Índice Fragmentación del ADN/DNA Fragmentation Index
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil-Sulfóxido
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno o “Radicales Libres”
IA	Inseminación Artificial
ICSI	Microinyección Intracitoplasmática de Espermatozoides
ISNT	Técnica In Situ Nick Translation
IVF	Fertilización in vitro
LDLs	Lipoproteínas de Baja Densidad
LIN	Índice de Linearidad
MF	Metilformamida
MP	Motilidad Progresiva
MT	Motilidad Total

NAC	No Adecuados para la Congelación
NC	Semen No Centrifugado
NP	No Procesados
PRE	Pura Raza Española
PVP	Polivinilpirrolidona
rSDF	Tasa de Fragmentación del ADN
TUNEL	Técnica Terminal dUTP Nock-End Labeling
SCD	Evaluación de la Dispersión de la Cromatina Espermática/ Sperm Chromatin Dispersion
SCSA	Evaluación de la Estructura de la Cromatina Espermática/Sperm Chromatin Structure Assay
STR	Índice de Rectitud
VAP	Velocidad Promedio
VCL	Velocidad Curvilínea
VSL	Velocidad Rectilínea
WOB	Índice de Oscilación

CAPÍTULO 11: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboagla EM; Terada T, 2003. Trehalose-enhanced fluidity of goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* 69, 1245-1250.
- Agarwal A; Allamaneni SS, 2004. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol.* 56, 235-245.
- Agarwal A; Makker K; Sharma R, 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor fertility: an update. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59, 2-11.
- Aires VA; Hinsch KD; Mueller-Schloesser F; Bogner K; Mueller-Schloesser S; Hinsch E, 2003. In vitro and in vivo comparison of egg-yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60, 269-279.
- Aisen EG; Álvarez HL; Venturino A; Garde JJ, 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen extender. *Theriogenology* 53, 1053-1061.
- Aisen EG; Medina VH; Venturino A, 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57, 1801-1808.
- Aitken RJ, 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 659-668.
- Álamo D, Batista M, González F, Rodríguez N, Cruz G, Cabrera F, Gracia A, 2005. Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152°C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology* 63, 72-82.
- Alvarenga MA; Leao KM; Papa FO; Landim-Alvarenga FC; Squires EL, 2000a. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. *Proceeding of the 14th International Congress on Animal Reproduction- Stockholm Abstracts* 2, 157.
- Alvarenga MA; Landim-Alvarenga FC; Moreira RM; Cesarino MM, 2000b. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet. J.* 32, 541-545.

- Alvarenga MA; Leao KM; Papa FO; Landim-Alvarenga FC; Medeiros ASL; Gomes GM, 2003. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. Proceedings of the Workshop on Transporting Gametes and Embryos – Havemeyer Foundation Monograph series 12, 74-76.
- Alvarenga, MA; Papa, FO; Landim-Alvarenga, FC; Medeiros, ASL, 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. Anim. Reprod. Sci., 89, 105–113.
- Alvarenga MA; Melo CM; Magalhaes LCO; Papa FO, 2010. A new method to concentrate equine sperm. Anim. Reprod. Sci. 121, 186-187.
- Álvarez JG; Storey BT, 1993. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. J. Androl. 14, 199-209.
- Álvarez AL, Crespo F, Gómez Cuetara C, Mateos, E.; Serres, C, 2004. Cryopreservation of Zamorano-Leonés donkey sperm using different amides. Reprod. Domest. Anim. 39, 267.
- Álvarez AL, 2005. Actuaciones para la conservación del asno Zamorano-Leonés. Inseminación Artificial con semen refrigerado y congelado. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, España. pp. 69.
- Amann RP; Hammerstedt RH, 1980. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. Biol. Reprod. 23, 647–656.
- Amann, RP; Pickett, BW, 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J. Equine Vet. Sci. 7, 145–173.
- Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H, 2002. New trends in gamete's cryopreservation. Mol. Cell. Endocrinol. 187, 77-81.
- Aravindan GR; Bjordahl J; Jost LK; Evenson DP, 1997. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. Exp. Cell Res. 236(1), 231-237.
- Ashwood-Smith MJ, 1987. Mechanisms of cryoprotectant action. En: Temperature and Animal Cells. Bowler, K., Fuller, B.J. (Eds.); Biologists Ltd., Cambridge, UK, pp. 395–406.

- Aurich C; Seeber P; Muller-Schlosser F, 2007. Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 degrees C. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 445-448.
- Aurich, C., 2008. Recent advances in cooled-semen technology. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 268-275
- Avery B; Greve T, 1995. Impact of Percoll[®] on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology* 44(6), 871-878.
- Ayuso-Hernando M; Gutiérrez-Cepeda L; Villalva M; Serres C, 2011. Aumento de la fertilidad mediante técnicas de procesamiento avanzado de semen: Caso Clínico. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 5(2), 36-48.
- Aziz N; Saleh RA; Sharma RK; Lewis-Jones I; Esfandiari N; Thomas AJ; Agarwal A Jr, 2004. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil. Steril.* 81, 349-354.
- Bailey J; Buhr M, 1994. Cryopreservation alters the Ca⁺⁺ flux of bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 74, 45-51.
- Ball BA; Vo AT; Baumber J, 2001. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 62, 508-515.
- Ball BA; Vo A, 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J. Androl.* 22(6), 1061-1069.
- Barker CAV; Gandier JCC, 1957. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 21, 47-51.
- Barth A.D., Oko R.J. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames, Iowa: Iowa State University Press.
- Barros T; Cunha I; Do Vale L; Rodrigues T; Castro F; Costa R; Pandolfi E; Rosana E; Obino E, 2008. Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. *Ciência Rural, Santa Maria* 38(7), 1972-1977.

- Bartoov B., Kalay D., Mayevsky A. 1981. Sperm motility analyzer (SMA), a practical tool of motility and cell concentration determinations in artificial insemination centers. *Theriogenology* 15, 173-182.
- Baumber J; Ball BA; Gravance CG; Medina V; Davies-Morel MC, 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.* 21, 895-902.
- Baumber J; Vo A; Sabeur K; Ball BA, 2002. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology* 57, 1025-1033.
- Baumber J; Ball BA; Linfor JJ; Meyers SA, 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J. Androl.* 24, 621-628.
- Bedford SJ; Jasko DJ; Graham JK; Amann RP; Squires EL; Picket BW, 1995. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 43, 955-967.
- Bencharif D; Amirat L; Anton M; Schmitt E; Desherces S; Delhomme G; Langlois ML; Barriere P; Larrat M; Tainturier D, 2008. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 70, 1478-1488.
- Benito, D., Álvarez, A., Crespo, F., Mateos, E., Gómez-Cuétara, C., Serres, C., 2003. Análisis computerizado del semen de caballo de Pura Raza Española. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal, Las Palmas, España.
- Bergqvist AS; Johannisson A; Bäckgren L; Dalin AM; Rodriguez-Martinez H; Morrell JM, 2011. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa through Androcoll™-E does not adversely affect their capacitation-like status, as measured by CTC staining. *Reprod. Domest. Anim.* 46(1), 74-78.
- Bianchi I; Calderam K; Maschio EF; Madeira EM; da Rosa UR; Corcini CD; Bongalhardo DC; Correa EK; Lucia Tjr; Deschamps JC; Correa MN, 2008. Evaluation of amides and centrifugation temperatura in boar semen cryipreservation. *Theriogenolog* 69, 632-638.

- Blanchard, TL; Varner, DD; Schumacher, JS, 1998. Examination of the stallion for breeding soundness. En: Manual of Equine Reproduction, 3ª Edición. Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D (Eds.); Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, pp. 127-142.
- Bousseau S; Brillard JP; Marguant-Le GB; Guerin B; Camus A; Lechat M, 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine sperm frozen in egg yolk or lecithin based diluents. Theriogenology 50, 699-706.
- Brahem, S; Mehdi, M; Elghezal, H; Saad, A, 2011. Semen processing by density gradient centrifugation is useful in selecting sperm with higher double-strand DNA integrity. Andrologia, 43(3), 196-202.
- Brinsko S.P., Crockett E.C., Squires E.L., 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. Theriogenology 54, 129-36.
- Brinsko SP, 2006. Insemination doses: how low can we go?. Theriogenology 66, 543-550.
- Brinsko S.P., Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Hinrichs K., Hartman D, 2011. En: Manual of equine reproduction. 3ª Edición. Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, USA.
- Bungum, M; Bungum, L; Giwercman, A, 2011. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. Asian J. Androl. 13, 69-75.
- Buranaamnuay K; Grossfeld R; Struckmann C; Rath D, 2011. Influence of cryoprotectants glycerol and amides, combined with antioxidants on quality of frozen-thawed boar sperm. Anim. Reprod. Sci. 127, 56-61.
- Burns PJ, 1992. Modification of Kenney's extender for cryopreservation of equine spermatozoa. Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction - The Hague 4, 1849-1851.
- Burns PJ; Reasner DS, 1995. Computerized analysis of sperm motion: effect of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. J. Equine Vet. Sci. 15, 377-380.

- Bussalleu E; Pinart E; Rivera MM; Arias X; Briz M; Sancho S; García-Gil N; Bassols J; Pruneda A; Yeste M; Casas I; Rigau T; Rodríguez-Gil JE; Bonet S, 2008. Effects of filtration of semen doses from subfertile boars through neuter Sephadex columns. *Reprod. Domest. Anim.* 43(1), 48-52.
- Cancel AM; Lobdell D; Mendola P; Perreault D, 2000. Objective evaluation wing assisted reproductive sperm analysis. *Hum. Reprod.* 15, 1322-1328.
- Carvalho EC; Paes de Arruda R; Furugen A; Nascimento J; Fernandes J; Mazza PE, 2008. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 119-131.
- Casarett GW, 1953. A one-solution stain for spermatozoa. *Stain Technol.* 28, 125-127.
- Centola GM; Herko R; Andolina E; Weisensel S, 1998. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery motility parameters and hyperactivation. *Fertil. Steril.* 70, 1173-1175.
- Chakrabarty J; Banerjee D; Pal D; De J; Ghosh A; Majumder GC, 2007. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology* 54, 27-35.
- Chalah T; Seigneurin F; Blesbois E; Brillard JP, 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology* 39, 185-191.
- Cerny KL; Hughes S; Campos JR; Coleman RJ; Troedsson MH; Squires EL, 2012. Fertility of mares inseminated with frozen-thawed semen processed by single layer centrifugation through a colloid. *J. Equine Vet. Sci.* 32(5), 289-291.
- Chenier T; Merkies K; Leibo S; Plante C; Johnson W, 1998. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. *Proceedings of the 44th annual convention of the American Association of Equine Practitioners - Baltimore* 44, 5-6.
- Chohan KR; Griffin JT; Lafromboise M; De Jonge CJ; Carrell DT, 2006. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J. Androl.* 27(1), 53-59.

- Choi, YH; Love, CC; Varner, DD, 2006. Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology*, 65, 808–819.
- Claassens, OE; Menkveld R; Harrison KL, 1998. Evaluation of three substitutes for Percoll in sperm isolation by density gradient centrifugation. *Human Reprod.* 13(11), 3139-3143.
- Clulow JR; Maxwell WMC; Evans G; Morris LHA, 2007. A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Aust. Vet. J.* 85, 232-235.
- Cochran JD; Amann RP; Squires ED; Pickett BW, 1983. Fertility of frozen-thawed stallion semen extended in lactose-EDTA-egg yolk extender and packaged in 1.0 mL straws. *Theriogenology* 20, 735-741.
- Cochran, JD; Amann, RP; Froman, DP; Pickett, BW, 1984. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the postthaw motility of equine sperm. *Theriogenology* 22, 25–38.
- Colenbrander B; Gadella BM; Stout TA, 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 305–311.
- Contri A; Valorz C; Faustini M; Wegher L; Carluccio A, 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* 74, 424-435.
- Cortés-Gutiérrez EI; Dávila-Rodríguez MI; López-Fernández C; Fernández JL; Gosálvez J, 2007. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urol. Esp.* 31(2), 98-109.
- Cortés-Gutiérrez, EI; Crespo, F; Gosálvez, A; Dávila-Rodríguez, MI; López- Fernández, C; Gosálvez, J, 2008. DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano_leonés, a breed at risk of extinction. *Theriogenology* 69, 1022–1032.
- Cortés-Gutiérrez E; Crespo F; Serres-Dalmau C; Rozas AL Gdl; Dávila-Rodríguez MI; López-Fernández C; Gosálvez J, 2009. Assessment of Sperm DNA Fragmentation in Stallion (*Equus caballus*) and Donkey (*Equus asinus*) Using the Sperm Chromatin Dispersion Test. *Reprod. Dom. Anim.* 44, 823–828.
- Correa LM; Thomas A; Meyers SA, 2007. The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreed motility. *Biol. Reprod.* 77, 942-953.

- Crabo, BG; Loseth, KJ; Weidel, L, 1992. Trapping of morphological types of bull spermatozoa by Sephadex/glass wool filters. In: Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, The Hague, The Netherlands, p. 423-425.
- Cristanelli MJ; Amann RP; Squires EL; Pickett BW, 1985. Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* 24, 681-686.
- Cross NL; Morales P; Overstreet JW; Hanseon FW, 1986 Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.* 15, 213-26.
- Crespo F, 2005. Estudio de la congelación de semen e inseminación artificial en el asno zamorano-leonés. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, España. Pp. 111-114.
- Curry MR, 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod.* 5, 46-52.
- Dalimata AM; Graham JK, 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Tehriogenology* 48, 831-841.
- Davis R; Katz D, 1993. Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.* 14, 385-394.
- Desai N; Sharma R; Makker K; Sanameugh E; Agarwal A, 2009. Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. *Feril. Steril.* 92, 1727-1631.
- Devireddy RV; Swanlund DJ; Olin T; Vincente W; Troedsson MH; Bischof JC; Roberts KP, 2002a. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biol. Reprod.* 66, 222-231
- Devireddy RV; Swanlund DJ; Alghamdi AS; Duoos LA; Troedsson MH; Bischof JC; Roberts KP, 2002b. Measured effect of colletion and cooling conditions on the motility and the wáter transport parameters at subzero temperaturas of equine spermatozoa. *Reprodcution* 124, 643-648.
- Dott HM, 1975. Morphology of stallion spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 23, 41-46.

- Douglas-Hamilton D.H., Smith N.G., Kuster C.E., Vermeiden J.P.W., Althouse G.C. 2005. Capillaryloaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *J. Androl.* 26, 115-122.
- Ecot P; Vidament M; de Mornac A; Perigault K; Clément F; Palmer E, 2000. Freezing of stallion semen : interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 56, 141-150.
- Ecot P; Decuadro-Hansen G; Delhomme G; Vidament M, 2005. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 245-248.
- Edmond, AJ; Teague, SR; Brinsko, SP; Comerford, KL; Waite, JA; Mancill, SS; Love, CC; Varner, DD, 2008. Effect of density-gradient centrifugation on quality and recovery rate of equine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 318.
- Edmond AJ, 2009. Effect of density gradient centrifugation on quality and recovery rate of equine sperm. Tesis Doctoral, Texas A&M University, , EEUU. Pp. 67-74.
- Edmond, AJ; Brinsko, SP; Love, CC; Blanchard, TL; Teague, SR; Varner DD, 2012. Effect of centrifugal fractionation protocols on quality and recovery rate of equine sperm. *Theriogenology* 77, 959-966.
- Englert Y; Lesage B; VanVooren JP; Liesnard C; Place I; Vannin AS; Emiliani S; Delbaere A, 2004. Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral disease. *Hum. Reprod. Update* 10, 149-162.
- Evenson DP; Darzynkiewicz Z; Melamed MR, 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 240, 1131-1133.
- Fabbri R Porcu E; Marsella T; Primavera MR; Seracchioli R; Ciotti PM; Magrini O; Venturoli S; Flamigni C, 1998. Oocyte cryopreservation. *Hum. Reprod.* 13(4), 98-108.
- Fahy GM; Lilley TH; Linsdell H; Douglas MS; Meryman HT, 1990. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology* 27, 247-268.

- Fatehi, AN; Bevers, MM; Schoevers, E; Roelen, BAJ; Colenbrander, B; Gadella, BM, 2006. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J. Androl.* 27, 176-188.
- Fernández JL; Vázquez-Gundín F; Delgado A; Goyanes VJ; Ramiro-Díaz J; de la Torre J; Gosálvez J, 2000. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat. Rer.* 453(1), 77-82.
- Fernández JL; Goyanes V; Gosálvez J, 2002. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). En: *FISH Technology -Springer Lab Manual* Editado por Dr. B. Rautenstrauss y Dr. Thomas Liehr. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Fernández JL; Muriel L; Goyanes V; Segrelles E; Gosálvez J; Enciso M y col., 2005. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil. Steril.* 84(4), 833-842.
- Ferrer MS; Lyle SK; Eilts BE; Eljarrah AH; Paccamonti DL, 2012. Factors affecting sperm recovery rates and survival after centrifugation of equine semen. *Theriogenology*, 78, 1814-1823.
- Froman D.P. 2007. Sperm motility in birds: insights from fowl sperm. *Society for Reproduction and Fertility* 65, 293-308.
- Futino DO; Mendes MC; Matos WN; Mondadori RG; Lucci CM, 2010. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 214-220.
- Gao DY; Liu J; Liu C; McGann LE; Watson PF; Kleinhans FW; Mazur P; Critser ES; Critser JK, 1995. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. Reprod.* 10, 1109-1122.
- García MA; Graham EF, 1989. Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. Effect of sugars and sugar alcohol on postthaw motility. *Theriogenology* 31, 1029-1037.

- García-Álvarez O; Maroto-Morales A; Ramón M; del Olmo E; Montoro V; Dominguez-Rebolledo AE; Bisbal A; Jiménez-Rabadán P; Pérez-Guzmán MD; Soler AJ, 2010. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of in vivo fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 74(6), 979-988.
- Garner, DL; Johnson, LA, 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.* 53, 276-84.
- Garner, DL; Thomas, CA; Allen, CH, 1997. Effect of semen dilution on bovine sperm viability as determined by dual-DNA staining and flow cytometry. *J. Androl.* 18, 324-31.
- Gebauer MR; Pickett BW; Komarek RJ; Gaunya WS, 1970. Motility of bovine spermatozoa extended in "defined" diluents. *J. Dairy Sci.* 53, 817-823.
- Geraghty, RM, 2006. Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen. *Eq. Vet. J.* 38, 224-229.
- Gil J; Rodríguez-Irazaqui M; Lundeheim N; Soderquist L; Rodríguez-Martínez H, 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology* 59, 1157-1170.
- Goolsby HA, Elanton JR, Prien SD, 2004. Preliminary Comparisons of Unique Freezing Technology to Traditional Cryopreservation Methodology of Equine Spermatozoa. *J. Eq. Vet. Sci.* 24(8), 314-318.
- Gomes GM; Jacob JCF; Medeiros ASL; Papa F; Alvarenga MA, 2002. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology* 58, 277-279.
- Gómez-Cuétara Aguilar C, 2000. Factores que afectan a la capacidad de congelación del semen equino. Inducción de la reacción acrosómica en semen fresco y descongelado. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, España. Pp. 121-125.
- Gorczyca W; Gong J; Darzynkiewicz Z, 1993. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and Nick translation assays. *Cancer Res.* 53(8), 1945-1951.

- Gosálvez J; López-Fernández C; Fernández JL; Gouraud A; Holt WV, 2011a. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from 11 species. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 951-961.
- Gosálvez, J; Ramirez, MA; López-Fernández, F; Evans, KM; Kjelland, ME; Moreno J, 2011b. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology* 75, 197-205.
- Graham, JK; Kunze, E; Hammerstedt, RH, 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod.* 43, 55-64.
- Graham JK, 1996. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 12, 119-130.
- Graham JK, 2000. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Stockholm Abstracts* 2, 307.
- Graham, JK, 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 239-247.
- Gravance, CG; Garner, DL; Miller, MG; Berger, T, 2001. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod. Toxicol.* 15, 5-10.
- Gutiérrez-Cepeda L; Crespo F; Gosálvez J; Serres C, 2011. Colloidal versus Simple Centrifugation. *II Congreso Argentino de Reproducción. Mendoza, Argentina.*
- Gutiérrez-Pérez O; Juárez-Mosqueda ML; Mota D; Trujillo ME, 2011. The disruption in actin-perinuclear theca interactions are related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. *Cryobiology* 62, 32-39.
- Hafez ESE, 2000. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. En: *Reproduction in farm animals*, 7ª Edición. Hafez, E.S.E. y Hafez. B (Eds.); Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp. 431-442.
- Hafez E, Hafez B, 2002. Caballos. En: *Reproducción e inseminación artificial en animales*, 7ª edición. McGraw-hill, Interamericana México pp. 199-223.

- Hammerstedt, R.H; Graham, JK; Nolan, JP, 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11, 73–88.
- Hammerstedt RH; Graham JK, 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29, 26–38.
- Hansen C., Vermeiden T., Vermeiden J.P.W., Simmet C., Day B.C., Feitsma H. 2006. Comparison of FACSCount AF system, improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SperVision, UlitMate and NuceoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. *Theriogenology* 66, 2188-2194.
- Heitland AV; Jasko DJ; Squires EL; Graham JK; Pickett BW; Hamilton C, 1996. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Eq. Vet. J.* 28, 47-53.
- Henkel RR; Schill WB, 2003. Sperm preparation for ART. *Reprod. Biol. And Endocrin.* 1, 108-130.
- Henry H; Snoeck PP; Cottorello AC, 2002. Post-thaw spermatozoa plasma integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology* 58, 245-248.
- Holt WV; North RD, 1991. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 91, 451-461.
- Holt WV, 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 3-22.
- Hoogewijs M, 2010. Automated and standardized analysis of equine semen and influences of centrifugation on equine semen preservation. Tesis Doctoral, Universidad de Ghent, Facultad de Medicina Veterinaria, Bélgica. Pp. 43.
- Hoogewijs, M; Morrell, J; Van Soom, A; Govaere, J; Johannisson, A; Piepers, S; De Schauwer, C; De Kruif, A; De Vlieghe, S, 2011. Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality. *Equine Vet. J.* 43(40), 35–41.
- Hoogewijs M; Piepers S; Govaere J; De Schauwer C; de Kruif A; Morrell J, 2012. Sperm longevity following pre-freeze sperm selection. 6th ISSR Abstracts *J. Equine Vet. Sci.* 32, 489.

- Hoshi K; Katayose H; Yanagida K; Yimura Y; Sato A, 1996. The relationship between acridine orange fluorescent of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil. Steril.* 66(4), 634-639.
- Hu JH; Li QW; Zan LS; Jiang ZL; An JH; Wang LQ; Jia YH, 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extender on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Anim. Reprod. Sci.* 117, 11-17.
- Jasko DJ; Moran DM; Farlin ME; Squires EL, 1991. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoa motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology* 35, 1059-1067.
- Jasko, DJ, 1992. Evaluation of stallion semen. *Vet. Clin. N. Am. (Equine)* 8, 129-148.
- Jasko, DJ; Little, TV; Lein, DH; Foote, RH, 1992. Determination of the relationship between sperm motility and fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *J Am. Vet. Med. Assoc.* 197(3), 389-394.
- Jasko DJ, 1994. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *ARS Veterinaria* 10(2),156-165.
- Jayaraman, V; Upadhya, D; Narayan, PK; Adiga, SK, 2012. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 557-563.
- Jeyendran RS; Van der Ven HH; Zaneveld LJ, 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch. Androl.* 29, 105-16.
- Jiang ZL; Li QW; Hu JH; Li WY; Zhao HW; Zhang SS, 2007. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology* 54, 301-304.
- Johannisson, A; Morrell, JM; Thorén, J; Jönsson, M; Dalin, AM; Rodriguez-Martinez, H, 2009. Colloidal centrifugation with Androcoll-ETM prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Anim. Reprod. Sci.* 116, 119-128.
- Jones RC; Martin IC, 1973. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5 degrees on the ultrastructure of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 35, 311-320.

- Karabinus DS; Evenson DP; Kaproth MT, 1999. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. *J. Dairy Sci.* 74, 3836–3848.
- Katila, T, 2001. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta Vet. Scand.* 42, 199-217.
- Kavak A, Johannisson A, Malmgren L, Rodriguez-Martinez H, Aidnik M, Einarsson S, 2001. Post-thaw evaluation of stallion spermatozoa using triple fluorescent staining and flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 349.
- Kavak A; Johannisson A; Lundeheim N; Rodriguez-Martinez H; Aidnik M; Einarsson S, 2003. Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 76, 205–216.
- Keith SL, 1998. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine Spermatozoa. Tesis Doctoral, Colorado State University Fort Collins, EEUU. pp. 104.
- Kenney RM; Bergman RV; Cooper WL; Morse GW, 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Equine Practitioners*, 327-336.
- Kenney RM, 1983. *Manual for clinical fertility evaluation of the stallion.* Hastings, NE: Society for Theriogenology.
- Kennery RM; Hustgen J; Piersan R; Witherspoon D; Simons J, 1983. Theriogenology and the equine, part II: The Stallion. *J. Soc. Theriog.* 9.
- Kirk ES; Graham JK; Bruemmer JE; Squires EL, 2001. Evaluating frozen equine semen by flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 348–349.
- Kirk ES; Squires EL; Graham JK, 2005. Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology* 64(6), 1422-1439.
- Knop K; Hoffmann N; Rath D, 2005. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 294–297.

- Kuisma P; Andersson M; Koskinen E; Katila T, 2006. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Vet. Scand.* 48, 14.
- Leeb T; Sieme H; Töpfer-Petersen E, 2005. Genetic markers for stallion fertility-lessons from jumen and mice. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 21-29.
- Leipold SD; Graham JK; Squires EL; McCue PM; Brinsko SP; Vanderwall DK, 1998. Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology* 49, 1537-1543.
- Lenz RW; Kjelland ME; Vonderhaar K; Swannack TM; Moreno JF, 2011. A comparison of bovine seminal quality assessments using different viewing chambers with a computer-assisted semen analyzer. *J. Anim. Sci.* 89, 383-388.
- Lewis, SEM, 2013. The place of sperm DNA fragmentation testing in current day fertility management . *Middle East Fertil. Soc J.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mefs.2013.01.010>.
- Lindahl J; Dalin AM; Stuhmann G; Morrell JM, 2012. Stallion spermatozoa selected by single layer centrifugation are capable of fertilization after storage for up to 96 h at 6°C prior to artificial insemination. *Acta Vet. Scand.* 54, 40.
- Liu YT; Warne PK, 1977. Computerized evaluation of sperm cell motility. *Comput. Biomed. Res.* 10(2), 127-138.
- Loomis PR; Amann RP; Squires EL; Pickett BW, 1983. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. *J. Anim. Sci.* 56, 687-693.
- Loomis PR, 2001. The equine frozen semen industry. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 191-200.
- Loomis PR, 2006. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. N. Am. (Equine)* 22, 663-676.
- Loomis PR; Graham JK, 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim. Reprod. Sci.* 105, 119-128.

- Lopes S; Sun JG; Jurisicova A; Meriano J; Casper RF, 1998. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 69(3), 528-532.
- López-Fernández C; Crespo F; Arroyo F; Fernández JL; Arana P; Johnston SD; Gosálvez J, 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* 68, 1240-1250.
- López-Fernández C; Johnston SD; Fernández JL; Wilson RJ; Gosálvez J, 2010. Fragmentation dynamics of frozen-thawed ram sperm DNA is modulated by sperm concentration. *Theriogenology* 74, 1362-1370.
- Love CC; Loch WL; Bristol F; Garcia MC; Kenney RM, 1989. Comparison of pregnancy rates achieved with frozen semen using two packaging systems. *Theriogenology* 31, 613-622.
- Love CC; Kenney RM, 1994. Relationship of sperm chromatin to fertility in the stallion. In: *Proceedings of the 40th Annual Convention AAEP*, pp. 21-22.
- Love CC; Kenney RM, 1998. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology* 50, 955-972;
- Love CC; Varner DD; Thompson JA, 2000. Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J. Reprod. Fertil.* 56, 93-100.
- Love CC; Thompson JA; Brinsko SP; Rigby SL; Blanchard TL; Lowry VK; y col., 2003. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology* 60, 1127-1138.
- Love CC; Brinsko SP; Rigby SL; Thompson JA; Blanchard TL; Varner DD, 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* 63, 1584-1591.
- Macías García B; Morrel JM; Ortega-Ferrusola C; González-Fernández L; Tapia JA; Rodríguez-Martínez H; Peña FJ, 2009a. Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. *Animal Reprod. Sci.* 114, 193-202.

- Macías García B; González Fernández L; Morrell JM; Ortega-Ferrusola C; Tapia JA; Rodríguez Martínez H; Peña FJ, 2009b. Single-layer centrifugation through colloid positively modifies the sperm subpopulation structure of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*,44, 523-526.
- Macías García B; Fernandez LG; Ferrusola CO; Salazar-Sandoval C; Rodríguez Am; Martínez HR; Tapia JA; Morcuende D; Peña FJ, 2011a. Membrane lipids of the stallion spermatozoa in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reprod. Domest. Anim.* 46(1), 141-148.
- Macías García B; González FL; Ortega FC; Morillo RA; Gallardo Bolanos JM; Rodríguez MH; Tapia JA; Morcuende D; Peña FJ, 2011b. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermamtozoa. *Theriogenology* 76, 811-818.
- Macías García B; Ortega FC; Aparicio IM; Miro-Moran A; Morillo RA; Gallardo Bolanos JM; González FL; Balao da Silva CM; Rodríguez MH; Tapia JA; Pena Fj, 2012a. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane pontential. *Theriogenology* 77, 1280-1289.
- Macías García B; González-Fernández L; Gallardo-Bolañosa JM; Peña FJ; Johannisson A; Morrell JM, 2012b. Androcoll-E large selects a subset of live stallion spermatozoa capable of producing ROS. *Anim. Reprod. Sci.* 132, 74-82.
- Macpherson ML; Blanchard TL; Love CC; Brinsko SP; Varner DD, 2002. Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallion. *Theriogenology* 58, 317-320.
- Madrid-Bury N; Pérez-Gutiérrez JF; Pérez-Garnelo S; Moreira P; Sanjuanbenito BP; Gutiérrez-Adán A; de la Fuente Martínez J, 2005. Relationship between nonreturn rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology* 64, 232-241.
- Magistrini M; Vidament M, 1992. L'insémination artificielle chez les equidés. *Rec. Méd. Vét. Spécial Reproduction des Equidés*, 959-966.
- Malgrem L, 1997. Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology* 48, 523-530.

- Mancill SS; Love CC; Brinsko SP; Edmond AJ; Foster ML; Teague JA, 2010. Effect of density gradient centrifugation on cryopreservation of equine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 121, 208-209.
- Manicardi GC; Bianchi PG; Pantano S; Azzoni O; Btzarro D; Bianchi U y col., 1995. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol. Reprod.* 52(4), 864-867.
- Mann T, 1975. Biochemistry of stallion semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47-52.
- Mari, G; Castagnetti, C; Rizzato, G; Mislei, B; Iacono, E; Merlo, B, 2011. Density gradient centrifugation of sperm from a subfertile stallion and effect of seminal plasma addition on fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 126, 96-100.
- Martin JC; Klug E; Günzel AR, 1979. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 27, 47-51.
- Mazur P, 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247, 125-142.
- Medeiros ASL; Gomes GM; Carmo MT; Papa FO; Alvarenga MA, 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 58, 273-276.
- Melo CM; Zahn FS; Martin I; Orlandi C; Dell'Aqua Jr JA; Alvarenga MA; Papa FO, 2007. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 27, 171-175.
- Metcalf E, 2007. The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology* 68, 423-428.
- Miró J; Medrano A; Lobo V; Peña A; Rigau T, 2003. Primeros resultados para la congelación de semen en el Garañón Catalán. *IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal*, pp. 87, Araucas, Las Palmas, España.
- Miró, J; Ocaña, M, 2006. El análisis seminal. Importancia, posibilidades y su relación con la fertilidad. En: *La reproducción en el semental*. *Equinus* n°16, III cuatrimestre 53-68.
- Moffet PD; Bruemmer JE; Card C; Squires EL, 2003. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. *Proceedings Society for Theriogenology Annual Conference*, p. 42.

- Moore AI; Squires EL; Bruemmer JE; Graham JK, 2006. Effects of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 26, 215-218.
- Morillo Rodriguez A; Balao da Silva C; Macías-García B; Gallardo Bolaños JM; Tapia JA; Aparicio IM; Ortega-Ferrusola C; Peña FJ, 2012. Dimethylformamide improves the in vitro characteristics of thawed stallion spermatozoa reducing sublethal damage. *Reprod. Domes. Anim.* 47(6), 995-1002.
- Morrell JM; Geraghty RM, 2006. Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen. *Equine Vet. J.* 38(3), 224-229.
- Morrell JM; Dalin AM; Rodriguez-Martinez H, 2008a. Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. *Anim. Reprod.* 5 121-126.
- Morrell JM; Peña FJ; Johannisson A; Dalin AM; Samper JC; Rodriguez-Martinez H, 2008b. Techniques for sperm clean-up and selection of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 333-334.
- Morrell JM; Dalin AM; Rodriguez-Martinez H, 2009a. Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. *Equine Vet J.* 41, 53-58.
- Morrell JM; Johannisson A; Dalin AM; Rodriguez-Martinez H, 2009b. Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single layer centrifugation through silica colloids. *Reprod. Domest. Anim.* ;44, 512.
- Morrell JM; Johannisson A; Dalin AM; Rodriguez-Martinez H, 2009c. Single layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled-up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology* 72, 879-84.
- Morrell JM; Thorén J; Jönsson M; Dalin A-M; Rodriguez-Martinez H, 2009d. Colloidal centrifugation with Androcoll-ETM prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Anim. Reprod. Sci.* 116, 119-128
- Morrell JM; Johannisson H; Strutz H; Dalin AM; Rodriguez-Martinez H, 2009e. Colloidal centrifugation of stallion semen: changes in sperm motility, velocity, and chromatin integrity during storage. *J. Equine Vet. Sci.* 29, 24-32.

- Morrell JM; Rodríguez-Martínez H, 2009. Biometric techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *The Open Andrology Journal* 1, 1-9.
- Morrell JM; Mari G; Kútvölgyi G; Meurling S; Iacono E; Mislei B y col., 2010a. Spermatozoa from stallion ejaculates processed by single layer centrifugation with Androcoll-E are capable of fertilization after artificial insemination. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 642-645.
- Morrell JM; Rodríguez-Martínez H; Johannisson A, 2010b. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared to sperm washing. *Reprod. Biomed. Online* 21, 429-36.
- Morrell JM; Rodríguez-Martínez H; Johannisson A, 2010c. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size: data from 3 breeding seasons. *Equine Vet. J.* 42, 579-585.
- Morrell JM; Macías García B; Peña FJ; Johannisson A, 2011a. Processing stored stallion semen doses by Single Layer Centrifugation. *Theriogenology* 76, 1424-1432.
- Morrell JM; Mari G; Kútvölgyi G; Meurling S; Mislei B; Iacono E; Rodríguez-Martínez H, 2011b. Pregnancies following artificial insemination with spermatozoa from problem stallion ejaculates processed by single layer centrifugation with Androcoll-E. *Reprod. Domest. Anim.* 46(4), 642-645.
- Morrell, 2012. Stallion Sperm Selection: Past, Present, and Future Trends. *J. Equine Vet. Sci.* 32, 436-440.
- Morrell JM; Pihla J; Dalina AM; Johannisson, 2012. A Restoration of seminal plasma to stallion spermatozoa selected by colloid centrifugation increases sperm progressive motility but is detrimental to chromatin integrity. *Theriogenology* 78, 345-352.
- Morrell JM, Timoney P, Klein C, Shuck K, Campos J, Troedsson M, 2013. Single-layer centrifugation reduces equine arteritis virus titre in the semen of shedding stallions. *Reprod. Domest. Anim.* 48(4), 604-612.
- Morris GJ, 2006. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Hum. Reprod.* 21(8), 2075-2083.

- Morris GJ; Frazer K; Green JE; Draper D; Grout BW; Fonseca F, 2007. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology* 68(5), 804-812.
- Mortimer D, 2000. Sperm preparation methods. *J. Androl.* 21(3), 357-66.
- Moussa M; Martinet V; Trimeche A; Tainturier D; Anton M, 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695-1706.
- Mousset-Simeon N; Rives N; Masse L; Chevallier F; Mace B, 2004. Comparison of six gradient media for selection of cryopreserved donor spermatozoa. *J. Androl.* 25(6), 881-884.
- Nascimento J; Raphael CF; Andrade AFC; Alonso MA; Celenghini E.CC; Arruda RP, 2008. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 28, 351-358.
- Neild D; Chaves G; Flores M; Mora N; Beconi M; Agüero A, 1999. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 51, 721-727.
- Neild DM; Chaves MG; Flores M; Miragaya MH; Gonzalez E; Agüero A, 2000. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia* 32, 351-355.
- Ogier de BB; Labbe C; Maise G, 1999. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology* 39, 177-184.
- Ortega-Ferrusola C; Sotillo-Galán Y; Varela-Fernández E; Gallardo-Bolaños JM; Muriel A; González-Fernández L; Tapia JA; Peña FJ, 2008. Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm. *J. Androl.* 29(2), 213-21.
- Ortega-Ferrusola, C; González-Fernández, L; Muriel, A; Macías-García, B; Rodríguez-Martínez, H; Tapia, JA; Peña, FJ, 2009. Does the Microbial Flora in the Ejaculate Affect the Freezeability of Stallion Sperm? *Reprod. Dom. Anim.* 44, 518-522.
- Ortega-Ferrusola C; Johannisson A; Peña Vega FJ; Tapia JA; Rodríguez-Martínez H; Dalin AM; Morrell KM, 2011. Effect of Different Extenders and Seminal Plasma on the

- Susceptibility of Equine Spermatozoa to Lipid Peroxidation After Single-Layer Centrifugation, Through Androcoll-E. *J. Equine Vet. Sci.* 31, 411-416.
- Pace MM; Graham EF, 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Sci.* 39, 1144-1149.
 - Pace MM; Sullivan JJ, 1975. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 23, 115-121.
 - Palmer E, 1984. Factors affecting stallion semen survival and fertility. Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination – Urbana, Champaign – USA p377.
 - Papa FO; Zahn FS; Dell'Aqua Jr JA; Alavarenga MA, 2002. Utilização Do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 26(3), 184-187.
 - Papa FO; Felício GB; Melo CM; Alvarenga MA; De Vita B; Avanzi BR; Dell'Aqua Jr JA, 2010. Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used for the cryopreservation of stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* 121, 171-172.
 - Parks JE; Graham JK, 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38, 209-222.
 - Parks JE; Lynch DV, 1992. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29(2), 255-266.
 - Paulson JD, Polakoski KL, 1977. A glass wool column procedure for removing extragenous material from the human ejaculate. *Fertil. Steril.* 28, 178.
 - Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H, 2004. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote* 12(2), 117-24.
 - Peña FJ, García BM, Samper JC, Aparicio IM, Tapia JA, Ferrusola CO, 2011. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols?. *Theriogenology* 76(7), 1177-1186.

- Pérez-Sánchez, F., Cooper, T.G., Yeung, C.H. and Nieschlag, E, 1994. Improvement in quality of cryopreserved human spermatozoa by swim-up before freezing. *Int. J. Androl.* 17, 115-120.
- Pertoft H, 2000. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 44, 1-30.
- Pickett BW, Faulkner LC, Sutherland TM, 1970. Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behaviour. *J. Anim. Sci.* 31:713-728.
- Pickett BW; Amann RP, 1993. Cryopreservation of semen. En: *Equine Reproduction*, 2ª Edición. McKinnon AO, Voss JL (Eds); Lea & Febiger, Philadelphia, USA, pp. 775-780.
- Pillet E; Batellier F; Duchamp G; Furstoss V; Le Vern Y; Kerboeuf D; Vidament M; Magistrini M, 2008. Freezing stallion semen in INRA96-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy Sci. Technol.* 88, 257-65.
- Pillet E; Duchamp G; Batellier F; Beaumal V; Anton M; Desherces S; Schmitt E; Magistrini M, 2011. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, 75(1), 105-114.
- Pillet E; Labbe C; Batellier F; Duchamp G; Beaumal V; Anton M; Desherces S; Schmitt E; Magistrini M, 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* 77, 268-279.
- Pojprasath T; Lohachit C; Techakumphu M; Stout T; Tharasanit T, 2011. Improved cryopreservability of stallion sperm using a sorbitol-based freezing extender. *Theriogenology* 75, 1742-1749.
- Polge C; Smith AU; Parkes AS, 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666.
- Pommer AC; Rutllant J; Meyers SA, 2002. The role of osmotic resistance of equine spermatozoal function. *Theriogenology* 58, 1373-1384.
- Pretlow TG; Pretlow TP, 1989. Cell separation by gradient centrifugation methods. *Methods in Enzymology* 171, 1-30.

- Quintero-Montero, A; Miró, J; Rigau, T; Rodríguez-Gil, JE, 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59, 1973-1990.
- Revell SG; Pettit MT; Ford TC, 1997. Use of centrifugation over iodixanol to reduce damage when processing stallion sperm for freezing. *Proceedings of the joint meeting society for the study of fertility abstract series* 92, 38.
- Ricker JV; Linfor JJ; Delfino WJ; Kysar P; Scholtz EL; Tablin F; Crowe JH; Ball BA; Meyers Sa, 2006. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol. Reprod.* 74, 359-365.
- Rijsselaere T; Van Soom A; Maes D; de Kruif A, 2003. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology* 60, 1553-1568.
- Rossi TC; Papa FO; Santos TB; Macedo LP; Alvarenga MA; Melo CM; y col., 2003. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 27, 350-352.
- Sakkas, D; Manicardi, GC; Tomlinson, M; Mandrioli, M; Bizzaro, D; Bianchi, PG; Bianchi, U, 2000. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum. Reprod.* 15(5), 1112-1116.
- Salisbury GW; VanDemark NL; Lodge JR, 1978. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. In: *Principles and techniques of freezing spermatozoa*. Freeman WC (Eds.); Freeman and Co, San Francisco, pp. 494-554.
- Samper J, 2000. Semen evaluation. *I Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina*. Sevilla.
- Samper JC, Estrada AJ, 2007. Evaluation of Raw Semen. En: *Current Therapy in Equine Reproduction*. Samper J; Pycock JF; McKinnon AO (Eds.); Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, pp. 253-257.
- Samper JC; Morris CA, 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 49, 895-903.

- Sharma RK; Agarwal A, 1996. Sperm quality improvement in cryopreserved human semen. *J. Urol.* 156, 1008-1012.
- Sieme H; Martinsson G; Rauterberg H; Walter K; Aurich C; Petzoldt R; Klug E, 2003. Application of Techniques for Sperm Selection in Fresh and Frozen-Thawed Stallion Semen. *Reprod. Dom. Anim.* 38, 134-140.
- Sieme H; Harrison RAP; Petrunkina AM, 2008. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 276-292.
- Silva SS; Henry M; Nunes SA; Mello SLV, 1997. Effect of packaging on the quality of frozen donkey seme, evaluated in vitro after thawing. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 21(3), 140-146.
- Silva AR; de Cassia Soares CR; Uchoa DC; MacHado da Silva LC, 2002. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *Vet. J.* 164, 244-246.
- Singh NP; McCoy MT; Tice RR; Schneider EL, 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp- Cell Res.* 175(1), 184-191.
- Smith AU; Polge C, 1950. Survival of spermatozoa at low temperatures *Nature* 166, 668-669.
- Sonfai T; Bodó S; Nagy S; Papp AB; Iváncsics J; Baranyai B; Góczy E; 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.
- Squires E.L., Crockett E.C., Graham J.K., Bruemmer J.E. 1999. Effect of centrifugation and cooling prior to freezing on post-thaw motility of equine spermatozoa. *Proceedings of the 45th annual convention of the American Association of Equine Practitioners – Albuquerque* 45:219-220.
- Squires EL; Keith SL; Graham JK, 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62, 1056-1065.
- Squires EL, 2011. Management of stallions for maximum reproductive efficiency. II *Congreso Argentino de Reproducción Equina, Mendoza, Argentina, Mayo 2011.*
- Stubbings, RB; Wosik, CP, 1991. Glass wool versus swim-up separation of bovine spermatozoa for in vitro fertilization. In: Bondioli K, Greve T, Wilmot I, editors. *Proceedings Annual Conference International Embryo Transfer Society, Bournemouth: UK*, 35, 276.

- Stuhmann G, 2011. Single layer centrifugation can improve poor quality frozen stallion ejaculates for AI. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 151-2.
- Terraciano PB; Bustamante-Folho IC; do Vale Miquelito L; Arlas TR; Castro F; Mattos RC; Passos EP; Oberst ER; Lima EOC, 2008. Comparison of freezing rates in cryopreservation of stallion semen in commercial extenders. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 350-351.
- Thompson DL; Pickett BW; Berndtson WE; Voss JL; Nett TM, 1977. Reproductive physiology of the stallion. VIII. Artificial photoperiod, collection interval and seminal characteristics, sexual behaviour and concentrations of LH and testosterone in serum. *J. Anim. Sci.* 44, 656-664.
- Thomson LK; Schulke L; Barone K; Zieschang JA; Clark AM, 2009. The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa separated for use in assisted reproductive technology is unaffected by the type of cryoprotectant used but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation. *Fertility and Sterility* 92(3), 991-1001.
- Thys M; Vandaele L; Morrell JM; Mestach J; Van Soom A; Hoogewijs M; Rodriguez-Martinez H, 2009. In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer(glycidoxypropyltrimethoxysilane) silane-coated silica colloidal centrifugation. *Reprod. Dom. Anim.* 44, 390-394.
- Tischner M, 1979. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J. Reprod.Fertil.* 27, 53-59.
- Tomlinson MJ; Moffatt O; Manicardi GC; Bizzaro D; Afnan M; Sakkas D, 2001. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum. Reprod.* 16(10), 2160-2165.
- Torres-Boggino F; Sato K; Oka A; Kanno Y; Hochi S; Oguri N; Braun J, 1995. Relationship among seminal characteristics, fertility and suitability for semen preservation in draft stallion. *J. Vet. Medical Sci.* 57, 225-229.
- Trimeche A; Anton M; Renard P; Gandemer G; Tainturier D, 1997. Quail egg yolk : a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology* 34, 385-393.

- Troedsson MHT; Lee CS; Franklin RD, 2000. The role of seminal plasma in post-breeding uterine inflammation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 56, 341–349.
- Troedsson MHT; Desvougges A; Alghamdi AS, 2005. Components in seminal plasma regulatingsperm transport and elimination. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 171–186.
- Tselutin K; Seigneurin F; Blesbois E, 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poult. Sci.* 78, 586-590.
- Vanderwall DK, 2008. Counting spermatozoa with a hemacytometer. *J. Equine Vet Sci.* 28, 244.
- Varner DD, 2008. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70, 448-462.
- Varner DD; Love CC; Brinsko SP; Blanchard TL; Bliss S; Carroll S; Eslick M, 2008. Semen Processing for the Subfertile Stallion. *J. Equ. Vet. Sci.* 28, 677-685.
- Verstegen J; Iguer-Ouada M; Onclin K, 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.
- Vidament, M; Dupree, AM; Julienne, P; Evian, A; Noue, P; Palmer, E, 1997. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48, 907–917.
- Vidament M; Ecot P; Noue P; Bourgeois C; Magistrini M; Palmer E, 2000. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 54, 907-919.
- Vidament M; Yvon JM; Couty I; Arnaud G; Nguekam-Feugang J; Noue P; Cottron S; Le Tellier A; Noel F; Palmer E; Magistrini M, 2001. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 201-218.
- Vidament M; Daire C; Yvon JM; Doligez P; Bruneau B; Magistrini M; Ecot P, 2002. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology* 58, 249-251.
- Vidament M, 2005. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod.Sci.* 89, 115–136.
- Vidament M; Vincent P; Yvon JM; Bruneau B; Martin FX, 2005. Glycerol in semen extender is a limiting factor in fertility in asine and equine species. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 302-305.

- Vizcarra JA; Ford JJ, 2006. Validation of the sperm mobility assay in boars and stallions. *Theriogenology* 66, 1091-1097.
- Vlasiu T; Groza I; Morar I; Cătană R, 2008. The effect of different freezing procedures on sperm Head morphometry in stallions. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine* 65(2), 146-151.
- Watson PF, 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 481-92.
- Watson PF; Martin IC, 1975. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C. *Aust. J. Biol. Sci.* 28, 145-152.
- Weiss S; Janett F; Burger D; H.ssig M; Thun R, 2004. The influence of centrifugation on quality and freezability of stallion semen. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 146, 285-93.
- Wilhelm KM; Graham JK; Squires EL, 1996a. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow-cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology* 46, 559-578.
- Wilhelm KM; Graham JK; Squires EL, 1996b. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. *Cryobiology* 33, 320-329.
- Williams WW, 1950. Cytology of the human spermatozoon. *Fertil. Steril.* 1, 199-215.
- Yildyz C; Kaya A; Aksoy M; Tekeli T, 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing-
Theriogenology 54, 579-585.
- Youle RJ; Strasser A, 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47-59.
- Zini A; Btelekt R; Phang D; Zenzes MT, 2001. Correlations between two markers of sperm DNA integrity. DNA denaturation and DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 75(4); 674-677.
- Zini, A; Libman, J, 2006: Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ*, 175, 495-500.

