

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**FACTORES GENÉTICOS Y COMPONENTES BIOQUÍMICOS DEL  
PLASMA SEMINAL EN EL CABALLO CRIOLLO COLOMBIANO Y  
SU RELACIÓN CON LA CALIDAD DE SEMEN  
CRIOPRESERVADO**

**Alexandra Usuga Suárez**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2017

**FACTORES GENÉTICOS Y COMPONENTES BIOQUÍMICOS DEL  
PLASMA SEMINAL EN EL CABALLO CRIOLLO COLOMBIANO Y  
SU RELACIÓN CON LA CALIDAD DE SEMEN  
CRIOPRESERVADO**

**Alexandra Usuga Suárez**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Doctor en Biotecnología**

Director:

Ph.D. Benjamín Alberto Rojano

Codirector:

Ph.D. Giovanni Restrepo Betancur

Línea de Investigación:

Biotecnología Animal

Grupos de Investigación:

Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA)

Grupo de Investigación Química de los Productos Naturales y los Alimentos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2017

*Dedicatoria*

*A mi familia, por su amor y apoyo incondicional*

*A mi pedacito de cielo en la Tierra*

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi comité tutorial por su orientación y asesoría académica; a mi director Benjamín Rojano, por su confianza, sus enseñanzas y valiosos aportes para el desarrollo de este trabajo; a mi co-director, Giovanni Restrepo Betancur, por su paciencia, disposición, motivación y apoyo incondicional; por ser mi guía, mi maestro y ejemplo a seguir. A Jorge Gómez Oquendo, director del grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA), por su acompañamiento y apoyo permanente en todo mi proceso de formación. Al equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología Animal del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid y del laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, por su invaluable ayuda en la etapa experimental de esta tesis. A los veterinarios y criaderos equinos que aportaron su tiempo y buena disposición en el proceso de recolección del material de investigación para este trabajo. Al Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, por la financiación de esta investigación.

# Contenido

	Pág.
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>8</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>9</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>10</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>14</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>15</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>16</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>18</b>
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
<b>Hipótesis.....</b>	<b>19</b>
Hipótesis alternas.....	19
Hipótesis nulas.....	19
<b>1.    Capítulo 1. Marco teórico.....</b>	<b>20</b>
1.1    Criopreservación del semen equino.....	21
1.1.1    Estrés oxidativo y criopreservación.....	25
1.2    Plasma seminal equino.....	29
1.2.1    Componentes del plasma seminal equino.....	30
1.2.2    El plasma seminal en la criopreservación de semen equino.....	42
1.3    Capacidad antioxidante del semen equino.....	44

1.3.1	Antioxidantes enzimáticos.....	45
1.3.2	Antioxidantes no enzimáticos.....	48
1.3.3	Capacidad antioxidante total (CAT) del plasma seminal.....	52
1.4	Marcadores moleculares asociados a la fertilidad del macho equino.....	54
1.4.1	Marcadores genéticos asociados a hormonas reproductivas.....	55
1.4.2	Marcadores genéticos asociados a las espermatogénesis.....	58
1.4.3	Marcadores genéticos asociados a la maduración espermática y al plasma seminal equino.....	58
1.4.4	Marcadores genéticos asociados al proceso de fertilización.....	62
1.5	Bibliografía.....	63
<b>2.</b>	<b>Capítulo 2. Association of the CRISP-3 protein and some of its polymorphisms with the quality of cryopreserved stallion semen.....</b>	<b>97</b>
2.1	Introduction.....	98
2.2	Materials and Methods.....	99
2.2.1	Sample collection.....	99
2.2.2	SNPs evaluation.....	100
2.2.3	CRISP-3 protein assessment.....	100
2.2.4	Semen cryopreservation.....	101
2.2.5	Semen quality evaluation.....	101
2.2.6	Statistical analysis.....	102
2.3	Results and Discussion.....	102
2.4	Conclusions.....	110
2.5	Acknowledgements.....	110
2.6	References.....	110
<b>3.</b>	<b>Capítulo 3. Effect of lyophilized seminal plasma components on the quality of fresh and cryopreserved stallion semen.....</b>	<b>115</b>
3.1	Introduction.....	116
3.2	Materials and Methods.....	118
3.2.1	Collection of research material.....	118
3.2.2	Assessment of biochemical components of stallion seminal plasma.....	118
3.2.3	Cryopreservation of stallion semen.....	120

3.2.4	Post-thaw semen quality evaluation.....	120
3.2.5	Statistical analysis.....	121
3.3	Results and Discussion.....	121
3.4	Conclusions.....	131
3.5	Acknowledgments.....	131
3.6	References.....	131
<b>4.</b>	<b>Capítulo 4. Supplementation with lyophilized seminal plasma according to its total antioxidant capacity can improve stallion semen freezability.....</b>	<b>137</b>
4.1	Introduction.....	138
4.2	Materials and Methods.....	139
4.2.1	Sample collection.....	139
4.2.2	Seminal plasma freeze-drying.....	140
4.2.3	Total antioxidant capacity (TAC) of seminal plasma evaluation.....	140
4.2.4	Semen cryopreservation.....	141
4.2.5	Semen quality evaluation.....	142
4.2.6	Statistical analysis.....	142
4.3	Results.....	143
4.4	Discussion.....	146
4.4	Acknowledgements.....	149
4.5	References.....	150
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>156</b>
<b>A.</b>	<b>Appendix 1. Supporting Information (Table S1).....</b>	<b>158</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1-1:</b> Acción de la enzima SOD y catalasa.....	46
<b>Figura 1-2:</b> Acción de la enzima GPx y GRD .....	46
<b>Figure 3-1:</b> Fresh semen assessment by levels of total protein and vitamins of seminal plasma .....	124
<b>Figure 3-2:</b> Fresh semen assessment by levels of ions of seminal plasma.....	125
<b>Figure 4-1:</b> Post-thaw semen assessment by treatment according to sample freezability.....	145



# Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1 1:</b> Concentración de algunas enzimas del plasma seminal equino.....	36
<b>Tabla 1-2:</b> Concentración de algunos iones en el plasma seminal equino.....	39
<b>Tabla 1-3:</b> Polimorfismos para los genes CRISP en equinos de la raza Hanoveriana.....	59
<b>Table 2-1:</b> Allele and genotype frequencies for SNPs.....	103
<b>Table 2-2:</b> Haplotypes frequency and description .....	104
<b>Table 2-3:</b> Results of the assessment of post-thaw semen.....	105
<b>Table 2-4:</b> Post-thaw semen assessment by CRISP3 genotypes .....	106
<b>Table 2-5:</b> Effect of allelic substitution on post-thawing seminal quality parameters..	107
<b>Table 2-6:</b> Post-thaw semen assessment by haplotypes.....	108
<b>Table 2-7:</b> Post-thaw semen assessment by levels of CRISP-3 protein.....	109
<b>Table 3-1:</b> Components of stallion seminal plasma .....	122
<b>Table 3-2:</b> Quality parameters of fresh stallion semen .....	123
<b>Table 3-3:</b> Post-thawing quality of stallion semen.....	126
<b>Table 3-4:</b> Post-thawing seminal quality by component concentration in seminal plasma .....	127
<b>Table 3-5:</b> Regression (top line) and correlations (lower line) coefficients between seminal plasma components and stallion cryopreserved semen quality parameters.....	129
<b>Table 4-1:</b> Supplementation treatments with lyophilized seminal plasma (LSP) according to total antioxidant capacity (TAC).....	141
<b>Table 4-2:</b> Results for semen assessment.....	143
<b>Table 4-3:</b> Post-thaw semen assessment by TAC treatment.....	144
<b>Table 4-4:</b> Post-thaw spermatic kinetics by samples freezability.....	146

## Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
AAPH	2,2'-azobis 2-amidino-propane
ABTS	2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
AC	Anhidrasa carbónica
AcP	Fosfatasa ácida
ACT	Activina
ADAMs	A desintegrin and metalloproteinase proteins
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHC	American Horse Council
ALH	Amplitude of lateral head displacement
AM	Abnormal morphology
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
Arg	Arginina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AST	Aspartato amino-transferasa
ATP	Adenosín trifosfato
AVIT	Vitamin A
BCF	Beat cross frequency
BSA	Bovine serum albumin
BSP	Bovine seminal plasma protein
CASA	Computer-assisted sperm analysis
CAT	Capacidad antioxidante total
CRISP	Proteínas secretoras ricas en cisteína
CVIT	Vitamin C
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECA	Enzima convertidora de la angiotensina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENA	Encuesta nacional agropecuaria
EROs	Especies reactivas de oxígeno

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
ESR	Receptor de estrógenos
EVIT	Vitamin E
FA	Fosfatasa alcalina
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FKBP6	Proteína de unión 6 a FK506
Fn-2	Fibronectinas tipo 2
FRAP	Ferric reducing power (Poder reductor férrico)
FSH	Hormona folículo estimulante
FST	Folistatina
GAG	Glicosaminoglicanos
GH	Hormona del crecimiento
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GNRHR	Receptor de hormona liberadora de gonadotropinas
GPx	Enzima glutatión peroxidasa
GGT	Glutamil transferasa
GLM	Generalized linear model
GPX/GRD	Sistema glutatión peroxidasa/reductasa
GRD	Enzima glutatión reductasa
GSH	Glutatión reducido
GSSG	Glutatión oxidado
HH	Hanks Heppes
HOS	Hypo-osmotic swelling test
HPLC	High performance liquid chromatography
HS	Hyperactive sperm
HSP	Heat Shock Proteins
IA	Inseminación artificial
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGFBP	Proteína de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina
INH	Inhibina
LDH	Lactato deshidrogenasa
LH	Hormona luteinizante
Lys	Lisina

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
MI	Membrane integrity
MP	Movilidad progresiva
MT	Movilidad total
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity (capacidad atrapadora de radicales oxígeno)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	Diode array detector
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
PI	Punto isoeléctrico
PIB	Producto interno bruto
PLC $\zeta$	Fosfolipasa C $\zeta$
PM	Progressive motility
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor de prolactina
PSA	Antígeno específico prostático
RA	Receptor de andrógenos
RLN	Relaxina
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
SAPA	Sociedad Argentina de Producción Animal
SCA®	Sperm Class Analyzer
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SOD	Superóxido-dismutasa
SP	Seminal plasma
SPATA	Proteína asociada a la espermatogénesis
SV	Sperm viability
TAC	Total antioxidant capacity
TGF $\beta$	Factor transformador de crecimiento $\beta$
Thr	Treonina
TM	Total motility
TP	Total protein
VAP	Average path velocity

**Abreviatura Término**

VCL	Curvilinear velocity
VE	Vitalidad espermática
VSL	Straight line velocity
ZAN	Zonadhesina

## Resumen

En los últimos años la industria equina mundial se ha expandido de manera considerable, enmarcando la necesidad de desarrollar sistemas productivos eficientes mediante el uso de biotecnologías reproductivas. En la especie equina, la utilización de características de tipo cuantitativo y de criterios objetivos al momento de evaluar el desempeño reproductivo y de realizar la selección de los reproductores, no es frecuente. Además, los procesos convencionales de congelación de semen equino, acarrear limitantes particulares, como son la significativa reducción de la viabilidad y capacidad fertilizante de los espermatozoides, y la extracción del plasma seminal, dado que la mayoría de su capacidad antioxidante se encuentra allí. Actualmente se desconoce en gran medida la función de los componentes del plasma seminal en relación a su aporte a la capacidad antioxidante, a la calidad del semen y la criotolerancia. El objetivo de esta investigación fue evaluar algunos factores genéticos y componentes bioquímicos del plasma seminal en equinos de la raza criollo colombiano y su relación con la calidad del semen criopreservado. Para lo anterior, se evaluaron cuatro polimorfismos (SNP) dentro del gen CRISP-3 en 100 equinos criollos colombianos, mediante la extracción de ADN y secuenciación de los fragmentos de interés. Se colectó el semen de 30 caballos y se recuperó el plasma seminal para ser liofilizado; en este último se hicieron mediciones de algunos componentes como proteínas totales, proteína CRISP-3, iones y vitaminas. El semen fue sometido a criopreservación, para lo cual fue suplementado con 2mg/mL de plasma seminal. Adicionalmente, el semen de cinco caballos fue colectado y suplementado con plasma seminal liofilizado de acuerdo a su capacidad antioxidante total para su posterior congelación. Post-descongelación se evaluaron parámetros de movilidad, cinética, viabilidad e integridad espermática. Para el análisis estadístico se ajustaron modelos lineales generalizados (GLM) y se realizaron correlaciones y regresiones. Se encontró una asociación entre el genotipo para CRISP-3 y la calidad del semen equino criopreservado. Así mismo, un nivel alto de esta proteína en el plasma seminal se relacionó con una mayor calidad espermática post-descongelación. La composición del plasma seminal resultó ser determinante en la calidad del semen fresco y criopreservado; igualmente, la suplementación del plasma seminal de acuerdo a su capacidad antioxidante total, demostró estar correlacionada con la congelabilidad del semen en esta especie.

**Palabras clave:** semen, CRISP-3, plasma seminal, congelabilidad, capacidad antioxidante, equino

## Abstract

In recent years the equine industry worldwide has been expanded considerably, showing the need to develop efficient production systems through the use of reproductive biotechnologies. In the equine species, the use of quantitative characteristics and objective criterias to evaluate the reproductive performance and to select the stallions is not frequent. In addition, conventional freezing process of equine semen, carries particular limitations, such as the reduction in the viability and the capacity fertilization of spermatozoa, and the extraction of seminal plasma, since most of its antioxidant capacity is there. Currently, the role of seminal plasma components in relation to their contribution to antioxidant capacity, semen quality and cryotolerance is largely unknown. The aim of this research is to evaluate genetic factors and biochemical components of seminal plasma in Colombian Creole horses and their relation with cryopreserved semen quality. For the above, four polymorphisms (SNP) within the CRISP-3 gene were evaluated in 100 Colombian creole horses, through DNA extraction and sequencing of the fragments of interest. Semen of 30 horses was collected and the seminal plasma was recovered to be lyophilized; in the latter, measurements of some components such as total proteins, CRISP-3 protein, vitamins and vitamins were made. Semen was supplemented with 2mg/mL of seminal plasma and cryopreserved. Additionally, semen of five horses was collected and supplemented with lyophilized seminal plasma according to its total antioxidant capacity for subsequent freezing. Post-thawing motility, kinetics, viability and sperm integrity parameters were evaluated. For statistical analysis, generalized linear models (GLM) were fitted and correlations and regressions were performed. It was found an association between the genotype for CRISP-3 and the quality of cryopreserved semen. Also, a high level of this protein in seminal plasma was related with higher post-thawing sperm quality. Composition of seminal plasma was determinant in the quality of fresh and cryopreserved semen; similarly, seminal plasma supplementation according to its total antioxidant capacity, proved to be correlated with semen freezability in this species.

**Keywords:** semen, CRISP-3, seminal plasma, freezability, antioxidant capacity, equine

## Introducción

En los últimos años la industria equina mundial se ha expandido de manera considerable, generando altas contribuciones económicas y diversificando los usos de esta especie para actividades deportivas, de entretenimiento, consumo y medicinales; además en un país como Colombia, continúa siendo una importante herramienta de transporte y trabajo. Lo anterior enmarca la necesidad de desarrollar sistemas productivos eficientes, en los que la reproducción y el uso de diferentes biotecnologías son fundamentales para el desarrollo de estrategias apropiadas para el mejoramiento genético.

Sin embargo en la especie equina, la utilización de características de tipo cuantitativo y de criterios objetivos al momento de evaluar el desempeño reproductivo y de realizar el proceso de selección de los reproductores, no es frecuente. Adicionalmente, existen limitaciones que conllevan a la ineficiencia en la implementación de algunas biotecnologías reproductivas, cuando se le compara con otras especies domésticas. Como es ampliamente conocido, el semen equino es extremadamente sensible a las alteraciones celulares generadas durante los procesos de conservación como la congelación; así mismo, la falta de selección de los reproductores ha conllevado a que exista una amplia variabilidad en la congelabilidad del semen, incluso entre individuos de una misma raza, lo que ha llevado a catalogarlos como ejemplares con buena o mala congelabilidad seminal.

Tradicionalmente en el proceso de criopreservación de semen equino se ha realizado la extracción del plasma seminal, debido a que se ha observado que en su totalidad genera un efecto deletéreo sobre la integridad y funcionalidad de los espermatozoides. Sin embargo, se conoce que el plasma seminal tiene importantes funciones en el metabolismo espermático y en el proceso de fertilización; y que es la principal fuente de antioxidantes solubles y enzimáticos para los espermatozoides. La extracción del plasma seminal, sumada al estrés oxidativo que experimentan las células espermáticas durante el proceso de criopreservación, por el marcado incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO), ha sido descrito como uno de los factores más relacionados con la baja fertilidad del semen equino criopreservado.

A pesar de que diversos estudios han reportado resultados prometedores para el mejoramiento de la calidad post-descongelación del semen equino, cuando se



suplementa con pequeñas cantidades de plasma seminal antes de su criopreservación, se desconoce en gran medida la función de sus componentes, su aporte a la capacidad antioxidante del plasma seminal y el efecto que cada uno de ellos cumple en relación a la calidad del semen y a la criotolerancia. Adicionalmente la alta variabilidad entre reproductores con relación a la composición bioquímica del plasma seminal, dificulta la obtención de resultados consistentes. Por otro lado, algunas proteínas del plasma seminal han sido sugeridas como marcadores de fertilidad potencial y de congelabilidad del semen equino, lo cual podría llegar a constituirse en una herramienta de selección de los reproductores, que permita establecer programas de mejoramiento genético basados en la utilización de criterios más objetivos.

Con la realización de esta investigación se abordan los temas anteriormente planteados, los cuales serán desarrollados mediante cuatro capítulos. De esta manera, en el primer capítulo de la tesis se hace una revisión de literatura que comprende los tópicos más relevantes y pertinentes para el entendimiento de la misma. En el segundo capítulo, se evalúan algunos polimorfismos dentro del gen CRISP-3, así como la presencia de esta proteína en el plasma seminal equino, y su relación con algunos parámetros de calidad seminal post-descongelación. Así mismo, se establecieron los haplotipos, las frecuencias alélicas y genotípicas para los polimorfismos estudiados. En el segundo capítulo, se describe la evaluación de algunos componentes del plasma seminal equino, como proteínas totales, iones y vitaminas, determinándose cuál era la relación de cada uno de ellos con la calidad del semen fresco. Adicionalmente, se realizó una suplementación con plasma seminal liofilizado para el proceso de congelación de semen, con el fin de determinar el efecto de su composición en la calidad espermática post-descongelación. Por último, se realizó una suplementación de plasma seminal liofilizado de acuerdo a su capacidad antioxidante, relacionándose con la calidad del semen equino criopreservado y evaluando su efecto en muestras de alta y baja congelabilidad.

El objetivo de esta investigación fue evaluar algunos factores genéticos y componentes bioquímicos del plasma seminal en equinos de la raza criollo colombiano y su relación con la calidad del semen criopreservado.

# Objetivos

## Objetivo general

Evaluar factores genéticos y componentes bioquímicos del plasma seminal en equinos (*Equus caballus*) de la raza criollo colombiano y su relación con la calidad de semen criopreservado

## Objetivos específicos

1. Determinar las variantes genóticas para algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) dentro del gen CRISP-3 en equinos de la raza criollo colombiano y su asociación con la calidad de semen criopreservado
2. Evaluar algunos componentes bioquímicos del plasma seminal de equinos de la raza criollo colombiano y su asociación con la calidad de semen criopreservado
3. Evaluar el efecto del aporte antioxidante del plasma seminal sobre la calidad post-descongelación del semen de equinos de la raza criollo colombiano.

# Hipótesis

## Hipótesis alternas

- Existe una relación del genotipo para CRISP-3, con la calidad y la criotolerancia del semen de equinos de la raza Criollo Colombiano.
- Existe una relación entre algunos componentes proteicos y antioxidantes del plasma seminal y la calidad del semen fresco y/o criopreservado en equinos de la raza Criollo Colombiano.
- El aporte antioxidante del plasma seminal, puede mejorar la calidad post-descongelación del semen de equinos de la raza Criollo Colombiano.

## Hipótesis nulas

- No existe relación del genotipo para CRISP-3 con la calidad y la criotolerancia del semen de equinos de la raza Criollo Colombiano.
- No existe relación entre algunos componentes proteicos y antioxidantes del plasma seminal y la calidad del semen fresco y/o criopreservado en equinos de la raza Criollo Colombiano.
- El aporte antioxidante del plasma seminal no puede mejorar la calidad post-descongelación del semen de equinos de la raza Criollo Colombiano.

## 1. Capítulo 1. Marco teórico

Actualmente los equinos son utilizados principalmente para actividades deportivas, entretenimiento, consumo, trabajo, transporte y usos medicinales. El valor de los caballos está determinado por su aptitud para el uso que se les desea dar, dependiendo de la raza, del grado de adiestramiento, de los logros obtenidos, del potencial de rendimiento y de otros factores (SAPA, 2011). Según información de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO (2014), el inventario mundial de equinos al año 2013 fue de 58'315.816, en América de 32'051.120 y en América del sur de 12'518.235 ejemplares. En Colombia, según la encuesta nacional agropecuaria ENA (2009) realizada por el DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística) el inventario de equinos alcanza 2.421.310 ejemplares, 224.051 asnales y 430.087 mulares (Paz, 2013).

El mayor productor mundial de equinos es China con 6'337.380 ejemplares y una producción de 193.080 toneladas de carne, mientras en Sur América, Argentina se ha constituido como el principal productor con 30.000 toneladas en el año 2012. Colombia produjo en 2012 un total estimado de 6750 toneladas de carne de esta especie, correspondientes a 54.000 cabezas sacrificadas. A nivel industrial, según datos del Concilio Americano del Caballo, para 2005 se estimó que la producción equina tuvo una contribución de 39 billones de dólares como impacto directo y de 102 billones de impacto total, tan solo en la economía de los Estados Unidos (AHC, 2005). A pesar de la importancia mundial esta industria, Colombia posee una baja participación en el mercado, y a pesar de ser el vigésimo país productor, no registra índices productivos significativos.

En Colombia la industria equina aporta el 0.14% del PIB total, que corresponde al 4,35% del PIB Agropecuario, proviniendo principalmente de la exportación de equinos. El promedio de exportaciones desde 1988 hasta el 2006 ha sido aproximadamente trescientos ejemplares por valores fluctuantes entre uno y dos millones de dólares por año. FEDEQUINAS calcula que la industria equina genera alrededor de 97.984 empleos directos en los 24.496 criaderos existentes en el país; adicionalmente, genera 122.480

empleos indirectos adicionales, es decir un total de 220.464 empleos en el país (FAO, 2010)

Dentro de las funciones de fomento de la conservación, el uso sostenible y el desarrollo de los recursos genéticos nacionales, El Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, ha formulado políticas como la Ley 427 de 1998, que estableció el desarrollo de programas de investigación con el objeto de promover la propagación y el mejoramiento de razas puras, de su producción, comercialización y promoción. Así mismo, creó el Comité nacional para el mejoramiento de la ganadería colombiana, mediante Resolución No. 249 de noviembre de 2003 con modificaciones en el 2008 (Resolución 171), con el objeto de incentivar la productividad del sector pecuario a través del mejoramiento de las especies que la conforman, incluyendo la especie equina (FAO, 2010). Por otro lado, este Ministerio ha incluido dentro de las cadenas productivas para investigación, desarrollo e innovación, la cadena equina, asnal y mular, priorizando entre diferentes demandas del sector, el mejoramiento genético y la preservación de las razas nativas (Siembra, 2013).

## **1.1 Criopreservación del semen equino**

En los últimos años, el uso de semen equino criopreservado ha aumentado progresivamente debido a sus múltiples ventajas (Squires, 2013). Entre ellas, se encuentra la posibilidad de preservar el material genético de reproductores valiosos para su posterior uso, incluso luego de su fallecimiento. Adicionalmente, se facilita su comercialización y distribución a nivel internacional, lo que permite un mejoramiento genético más acelerado. Así mismo en países estacionarios, el uso de semen equino congelado, puede ser más conveniente y económico para suplir las necesidades de cubrición de las hembras por medio de inseminación artificial (IA), durante la estación de monta (Loomis, 2001; Squires, 2013). Sin embargo, también existen varias desventajas. La mayor de ellas, es la disminución de la capacidad fecundante del semen equino congelado, cuando se compara con el semen refrigerado de muchos de los reproductores (Loomis y Graham, 2008; Squires, 2013; Gibb y Aitken, 2016). Además, no existen criterios de selección para fertilidad con semen congelado en la especie, a diferencia de lo que ocurre en bovinos, donde los toros han sido seleccionados durante años por la industria de la IA, basándose en su habilidad espermática para sobrevivir a la criopreservación, lo cual origina una respuesta positiva y uniforme a dicho proceso (Loomis y Graham, 2008)

En la especie equina la falta de selección de los reproductores, ha conllevado a que exista una amplia variabilidad en la congelabilidad del semen, incluso entre individuos. Lo anterior ha sido ampliamente estudiado en la especie equina, y los reproductores son comúnmente clasificados como “buenos” o “malos congeladores”, dependiendo de sus resultados de calidad seminal post-descongelación (Vidament *et al.* 2005; Hoffmann *et al.* 2011; Neto *et al.* 2014).

Por lo anterior, la metodología más utilizada para la conservación de semen equino, es posiblemente la refrigeración a 4°C. Esta técnica produce una reducción en la tasa metabólica de los espermatozoides, permitiendo extender su supervivencia. Sin embargo, el semen sólo puede ser almacenado durante pocas horas, dada la rápida reducción de su fertilidad (Ponglowhapan *et al.* 2004), la cual depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática al daño causado por el choque térmico (Sánchez *et al.* 2006). La congelación de semen y su almacenamiento en nitrógeno líquido, permiten su conservación por largos periodos de tiempo, alcanzando tasas de movilidad posteriores al proceso, del 60% al 70% en las especies bovina (Liu *et al.* 1998) y canina (Álamo *et al.* 2005) y del 55% al 70% para la especie porcina (Rodríguez y Wallgren, 2011). En la especie equina, se recomienda una movilidad post-descongelación  $\geq 30\%$  ó  $\geq 35\%$  para el uso de semen congelado-descongelado en programas de IA. Adicionalmente se requiere que presente como mínimo el 20% de movilidad progresiva 15 minutos después de la descongelación. Por otro lado, la morfología normal después de la descongelación debería ser del 70%, o un porcentaje muy similar al recomendado en el semen fresco (Lozino *et al.* 2011).

Como es conocido, el semen equino es extremadamente sensible a las alteraciones celulares generadas por la congelación, al estrés osmótico resultado de la exposición a medios hipertónicos, y adicionalmente a los cambios osmóticos inducidos durante el proceso (Ball, 2008; Devireddy *et al.* 2002). Durante la congelación por debajo de 0°C, comienza a formarse hielo extracelular, exponiendo a los espermatozoides a condiciones hiperosmóticas, lo cual es exacerbado por la adición de crioprotectores no permeables (Pegg, 2007; Gibb y Aitken, 2016). Lo anterior induce la deshidratación celular, que a pesar de ser necesaria para mantener la viabilidad post-descongelación de los espermatozoides, podría generar como resultado del estrés osmótico, daños en la membrana plasmática (Morris *et al.* 2007), en el ADN (Sardoy *et al.* 2008) y la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Burnaugh *et al.* 2010).

Así mismo, el enfriamiento rápido induce una fase de transición de la membrana plasmática de los espermatozoides, que cambia de un estado líquido a un estado de

gel, lo cual genera pérdida de lípidos de la membrana y un reacomodamiento de los lípidos y las proteínas dentro de la misma. Esto a su vez, conduce a que se vuelvan permeables al agua y a algunos iones, conllevando finalmente a que se presente en el espermatozoide anomalías en su movilidad (movimiento circular y defectos reflejos en la pieza media) y a su muerte prematura (Loomis y Graham, 2008).

En algunas especies como la equina, se ha observado mayor susceptibilidad de los espermatozoides al choque térmico. Esta diferencia entre especies, se atribuye principalmente a la diferencia en la composición lipídica de las membranas plasmáticas (Loomis y Graham, 2008; García *et al.* 2011). Las membranas que presentan una relación colesterol:fosfolípidos más alta, exhiben temperaturas de transición más bajas; incluso, si el contenido de colesterol es suficientemente alto, la membrana no experimentaría su fase de transición al estado de gel (Loomis y Graham, 2008). Moore *et al.* (2005a), observaron un aumento en la viabilidad post-descongelación de espermatozoides equinos al ser congelados con la adición de colesterol. Además se ha sugerido, que la diferencia en el contenido de colesterol en la membrana plasmática de los espermatozoides entre diferentes reproductores, podría afectar su criosupervivencia, explicando la alta variabilidad entre individuos (Loomis y Graham, 2008; García *et al.* 2011).

Los daños de las mitocondrias del espermatozoide son al parecer otro de los aspectos importantes durante la criopreservación del semen equino, dado que frecuentemente la evaluación morfológica de los espermatozoides después de la congelación y la descongelación, demuestran un moderado a marcado hinchamiento de la pieza media; representando una distensión de las mitocondria, y sugiriendo que estas organelas son un sitio con un significativo criodaño (Ball, 2008). También se han reportado cambios similares a los que ocurren en la capacitación en los espermatozoides criopreservados, en un proceso denominado "criocapacitación" (Thomas *et al.* 2006). Esta "capacitación prematura" puede generarse a partir de la pérdida de lípidos de la membrana espermática durante los procesos de congelación y descongelación, así como de la pérdida de factores decapacitantes que se eliminan con el plasma seminal (Moore *et al.* 2005b).

Una vez el semen equino ha sido colectado, el primer paso después de la evaluación inicial es la centrifugación, para concentrar los espermatozoides y para eliminar el plasma seminal (Squires, 2013). El uso de gradientes de densidad en la centrifugación ha aumentado la calidad y recuperación de esperma durante este proceso, al permitir la utilización de mayores fuerzas de gravedad, tiempos de centrifugación y la eliminación

de espermatozoides con alteraciones o muertos (Johannisson *et al.* 2009; Colleoni *et al.* 2011; Hoogewijs *et al.* 2011; Varela *et al.* 2015). Lo anterior, aumenta el número de espermatozoides disponibles y viables para su procesamiento y congelación (Squires, 2013).

Existen varias metodologías para la criopreservación del semen, las cuales varían principalmente en las velocidades de descenso de temperatura, en las concentraciones de los crioprotectores utilizados, y en los soportes de almacenamiento empleados. Varios crioprotectores han sido evaluados en el proceso de criopreservación, como el glicerol, el dimetilsulfóxido, el etilenglicol y la dimetilformamida, entre otros (Chenier *et al.* 1998; Mantovani *et al.* 2002; Medeiros *et al.* 2002). Estas sustancias juegan un papel importante al disminuir la exposición al choque osmótico (Hoffmann *et al.* 2011), estabilizar las biomoléculas y estructuras celulares (Peña *et al.* 2011) y limitar los efectos deletéreos de las EROs. Adicionalmente, la mayoría de diluyentes para congelación de semen equino, incluyen leche desnatada, yema de huevo y disacáridos como sucrosa o trehalosa (Oldenhof *et al.* 2013).

Los crioprotectores permeables, aumentan la permeabilidad de la membrana plasmática al agua, permitiendo que los espermatozoides se continúen deshidratando a temperaturas inferiores a 0°C, evitando la formación de cristales de hielo intracelulares (Akhoondi *et al.* 2012). Adicionalmente se ha sugerido que estos crioprotectores, pueden reemplazar el agua intracelular e interactuar con fosfolípidos y otras biomoléculas a través de puentes de hidrógeno (Oldenhof *et al.* 2013).

Por otro lado, los protocolos de congelación rápida y ultrarrápida previenen la formación de hielo intracelular mediante la deshidratación de la célula, por su exposición a altas concentraciones de crioprotectores permeables (4 a 6 mol/L) y azúcares. La congelación rápida involucra un enfriamiento rápido por la exposición de las células a vapores de nitrógeno líquido, mientras la congelación ultrarrápida requiere sumergirlas directamente en nitrógeno líquido, para un enfriamiento ultrarrápido (Albarracín, 2005). La vitrificación corresponde a una técnica de criopreservación ultrarrápida, que desencadena la formación de un estado vítreo similar al cristal, sin presencia alguna de cristales de hielo intracelular y extracelular; disminuyendo así el daño de las células (Bailey *et al.* 2000; Orief *et al.* 2005). Las ventajas de la vitrificación son grandes respecto a los métodos tradicionales de congelación, por sus menores costos en equipos, su sencillez, y la disminución del tiempo de exposición a bajas temperaturas. Sin embargo, presenta como dificultades, los efectos nocivos del choque osmótico por el uso de soluciones hipertónicas, los efectos tóxicos causados por la naturaleza



química y las altas concentraciones de crioprotectores, y las alteraciones celulares relacionadas con la exposición a bajas temperaturas (Lopera *et al.* 2007). En humanos, técnicas de vitrificación de espermatozoides sin crioprotectores, realizadas mediante la exposición directa de estas células al nitrógeno líquido en soportes especiales, han logrado preservar su habilidad para la fertilización, con tasas de movilidad mayores que en procesos de vitrificación convencional (Isachenko *et al.* 2004; Saki *et al.* 2009; Isachenko *et al.* 2011).

La tasa de enfriamiento, no parece ser el principal factor que afecta la congelabilidad del semen equino, ya que se ha reportado que tasas de congelación rápida desde  $-10^{\circ}\text{C}$  hasta  $-50^{\circ}\text{C}$ , conducen a una movilidad espermática post-descongelación similar (Squires, 2013). Sin embargo, la tasa de descongelación y la dilución de los crioprotectores después de este proceso, podría ser más relevante que la tasa de congelación (Vidament, 2005). Los espermatozoides equinos, parecen ser particularmente sensibles a la rehidratación y puede ser que una dilución seriada después de la descongelación, puede mejorar la fertilidad espermática (Squires, 2013). Durante la descongelación, el proceso inverso tiene lugar, y los espermatozoides están expuestos a condiciones hipotónicas. El hinchamiento espermático debido a la absorción de agua en estas condiciones, es más perjudicial que el estrés hipertónico, especialmente después de la criopreservación, debido a la presencia y aumento de EROs (Ortega *et al.* 2010; Oldenhof *et al.* 2013).

### **1.1.1 Estrés oxidativo y criopreservación**

Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón no apareado, y se comportan como moléculas altamente reactivas, mediante la sustracción de electrones desde distintas moléculas para lograr su estabilidad (Membrillo *et al.* 2003; Lü *et al.* 2010). Ciertos niveles de radicales libres son necesarios para el funcionamiento normal de las células espermáticas, incluyendo procesos como la capacitación, la hiperactivación, la reacción acrosómica, la fusión al oocito y la fertilización (Chi *et al.* 2008). Sin embargo, cuando se presenta una producción exagerada de especies reactivas de oxígeno (ERO) como el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el anión hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) como precursor de los radicales libres, la capacidad antioxidante del semen es rebasada, dando lugar al proceso denominado “estrés oxidativo”. Dicho proceso contribuye al daño estructural de la cromatina, las membranas,

los lípidos, azúcares y las proteínas del espermatozoide (Ball, 2008; Membrillo *et al.* 2003).

Durante la criopreservación, los espermatozoides presentan un aumento de la concentración de calcio intracelular, un aumento de la generación de EROs, y una reducción en su capacidad antioxidante debido a la eliminación del plasma seminal (Vasconcelos *et al.* 2013), al daño estructural del citoesqueleto, y a la alteración de las enzimas antioxidantes (Isachenko *et al.* 2004).

Las mitocondrias espermáticas son la principal fuente de EROs en el espermatozoide, pudiéndose considerar como las estructuras celulares más sensibles durante los procesos de congelación y descongelación, en los que se aumenta la producción de especies reactivas (Vasconcelos *et al.* 2013). A diferencia de otras especies mamíferas, en los espermatozoides equinos, la demanda de energía se suple principalmente a través de la fosforilación oxidativa realizada en las mitocondrias (Ferrusola *et al.* 2010; Gibb *et al.* 2014), la cual es una ruta más eficiente para la producción de ATP que la glicólisis (Storey, 2008). Ante la presencia de daño mitocondrial, los espermatozoides sufren una pérdida rápida de movilidad y velocidad y una disminución dramática de ATP (Gibb *et al.* 2014). Adicionalmente, en la cadena transportadora de electrones mitocondrial, cerca del 1-3% del O<sub>2</sub> reducido, forma anión superóxido durante el proceso de fosforilación oxidativa (Gibb y Aitken, 2016). Por otro lado, el desequilibrio osmótico generado durante los procesos de criopreservación, puede aumentar la permeabilidad de la membrana mitocondrial, permitiendo que las EROs se difundan rápidamente y activen una maquinaria intrínseca similar al mecanismo de apoptosis (Vasconcelos *et al.* 2013).

El exceso de EROs, como el anión superóxido, producido en las mitocondrias durante el proceso de criopreservación, conlleva a un aumento de la peroxidación lipídica y la producción de aldehídos electrofílicos altamente reactivos. Estos aldehídos aducen proteínas funcionales, resultando en una pérdida de la movilidad espermática y daño mitocondrial, que puede desencadenar en apoptosis o daño oxidativo del ADN. Si estas alteraciones no conducen a la muerte celular, se podrían ocasionar mutaciones en las células germinales, y a su vez, pérdidas embrionarias o abortos (Aitken y Curry, 2011; Aitken *et al.* 2012). La pérdida de movilidad espermática, no sólo se debe a la peroxidación lipídica generada a causa de las EROs, sino también a la disminución concomitante del ATP, que compromete innumerables funciones dependientes de esta molécula, altera la homeostasis y acelera la muerte celular (Gibb y Aitken, 2016)

El estrés osmótico generado durante los procesos de criopreservación, ha sido relacionado con efectos adversos sobre la movilidad, la viabilidad y el potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides equinos, lo cual podría estar asociado con el estrés oxidativo (Ball *et al.* 2001a; Pommer *et al.* 2002); dado que el estrés osmótico tanto en condiciones hipotónicas como hipertónicas, puede incrementar la producción de anión superóxido en el semen equino (Burnaugh *et al.* 2007). Brum *et al.* (2008), asociaron la criopreservación con la presentación de cambios celulares relacionados con la apoptosis en los espermatozoides equinos; al evidenciar en éstos cambios significativos en el porcentaje de caspasas activas, en la actividad mitocondrial, en la permeabilidad de la membrana plasmática, en la movilidad total, y en la movilidad progresiva. Diferentes marcadores de apoptosis pueden ser usados para predecir la resistencia a la congelación de los espermatozoides de los ejemplares equinos (Ortega-Ferrusola *et al.* 2009).

Es así, como en el material germinal criopreservado el número de células con cambios asociados a la apoptosis aumenta en comparación con el semen fresco, dichas células generan grandes cantidades de EROs, lo cual posee el potencial para desacoplar el metabolismo oxidativo normal de los espermatozoides, conduciendo a que éstos se vean sometidos a estrés oxidativo (Ball, 2008; Peirouvi *et al.* 2007).

Adicionalmente los espermatozoides criopreservados, morfológicamente anormales y los neutrófilos, son importantes fuentes de EROs (Ball *et al.* 2001b, Baumber *et al.* 2002) y de otros lípidos usados como sustratos para la peroxidación, como los plasmalógenos y las esfingomielinas, los cuales favorecen las alteraciones del espermatozoide (Ogbuewa *et al.* 2010). El peróxido de hidrógeno es la principal especie reactiva relacionada con alteraciones espermáticas durante el almacenamiento; siendo generada a partir del anión superóxido, el cual es la principal EROs producida por el espermatozoide, por la rápida acción de la superóxido-dismutasa (SOD) (Burnaugh *et al.* 2007).

Las EROs producidas durante el proceso de criopreservación pueden causar fragmentación del ADN (Baumber *et al.* 2003; Wnuk *et al.* 2010), reacción acrosómica anormal, daños y pérdida de fluidez en la membrana de los espermatozoides debido a la peroxidación lipídica (Ball *et al.* 2000; Vasconcelos *et al.* 2013). La peroxidación es adicionalmente promovida por el alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados de los espermatozoides equinos (Aurich *et al.* 1997; García *et al.* 2011), los cuales a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres, generan de manera inicial gran cantidad de hidroperóxidos; subsecuentemente se generan una serie de compuestos

oxidados como dienos conjugados, cetonas, alquenos, alcanos, oxo e hidroxí ácidos, hidrocarburos saturados e insaturados como el etano y el pentano, y aldehídos saturados e insaturados (Nedyalka y Emma, 2001; Sanocka y Kurpisz, 2004). De esta manera, los ácidos grasos insaturados, al ser atacados por EROs, generan el radical peroxilo ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) y alcoxi ( $\text{RO}^{\bullet}$ ), los cuales sustraen un átomo de hidrógeno de un carbono del lípido adyacente para estabilizarse, generando el ácido o alcohol correspondiente. Esta sustracción, crea un radical en un carbono central que se combina con dióxígeno para crear otro peróxido lipídico, manteniéndose así la propagación de la peroxidación a través de la membrana (García *et al.* 2011)

En cuanto a las proteínas, existen tres maneras diferentes de que puedan ser alteradas a través del estrés oxidativo: mediante la modificación oxidativa de un aminoácido específico, el clivaje de péptidos mediado por radicales libres y la formación de enlaces proteicos debido a reacciones con productos de peroxidación lipídica (Lobo *et al.* 2010). El daño generado en el ADN, puede ocasionar producción de sitios libres de bases nitrogenadas, supresiones, modificación de las bases, rupturas de la cadena, enlaces cruzados ADN-proteína y rearrreglos cromosómicos. Se conoce que el radical hidroxilo, reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN, incluyendo las bases purinas y pirimidinas, así como la desoxirribosa. Así mismo, el peroxilo y radicales  $\text{OH}^{\bullet}$ , también intervienen en la oxidación del ADN (Dizdaroglu *et al.* 2002; Valko *et al.* 2004).

Respecto a los azúcares, durante las etapas iniciales de los procesos no enzimáticos de glicosilación, la fragmentación del azúcar produce especies de cadena corta como el glicolaldehído, el cual es muy corto para ciclar y por lo tanto es propenso a la auto-oxidación, formando el radical superóxido. La reacción en cadena resultante propagada por este radical, puede formar  $\alpha$  y  $\beta$ -dicarbonilos, que son mutágenos bien conocidos (Benov y Beema, 2003).

A pesar de que existe un paradigma de que los espermatozoides no viables o de baja calidad, son los que generan mayor cantidad de EROs, una hipótesis alternativa sugiere que espermatozoides de caballos de alta fertilidad, tras los procesos de criopreservación o de almacenamiento *in vitro*, al tener un metabolismo más rápido, presentan actividades más altas de fosforilación oxidativa, y por tanto, una mayor generación de EROs (Gibb *et al.* 2014).

Se ha descrito una correlación positiva entre la oxidación de las proteínas del semen, la movilidad y la viabilidad espermática; sugiriendo que la oxidación de las proteínas podría ser importante para la función del espermatozoide; mientras que la oxidación de los lípidos del plasma seminal es definida como un indicador de daño espermático.

Adicionalmente se ha evidenciado una correlación positiva entre los niveles de oxidación de lípidos y proteínas en el espermatozoides y en el plasma seminal, con la presencia de defectos severos en la función de los espermatozoides de equinos subfértiles, indicando que la oxidación de lípidos y proteínas podría ser útil para la identificación de machos con problemas de fertilidad (Morte *et al.* 2008).

## 1.2 Plasma seminal equino

El semen está compuesto por dos fracciones diferentes; los espermatozoides, que constituyen menos del 1% del volumen total y el plasma seminal, que consiste en un líquido producido por la red testicular, el epidídimo y las glándulas accesorias. Ambas fracciones, son expulsadas durante la eyaculación por contracciones uretrales (Kareskoski y Katila, 2008). El plasma seminal constituye una mezcla compleja de proteínas, iones y sustancias orgánicas de bajo peso molecular, como aminoácidos libres, monosacáridos, lípidos, poliamidas, prostaglandinas y hormonas esteroidales (Katila y Kareskoski, 2006)

Se conoce que el plasma seminal tiene diversas funciones en el metabolismo de los espermatozoides y en el proceso de fertilización, como la activación de la motilidad espermática, acción antimicrobiana, neutralización de metabolitos del esperma, entre otras. Además, es un mediador de la capacitación espermática y de la respuesta inflamatoria post-coital en el útero de las yeguas (Guasti *et al.* 2012). Adicionalmente, parece tener una función importante en la regulación del transporte de las células espermáticas dentro del oviducto (Troedsson *et al.* 2005), al disminuir las contracciones uterinas inmediatamente después de la inseminación y al incrementarlas cuatro horas después de la misma (Portus *et al.* 2005). También se ha descrito que actúa como tampón, al proveer la osmolaridad y el medio nutricional adecuado para los espermatozoides (Villemure *et al.* 2003); y como inductor de la ovulación en especies como bovinos, porcinos y camélidos (O'Leary *et al.* 2004; Ratto *et al.* 2005; Juyena y Stelletta, 2012). Así mismo, juega un rol importante en la interacción de espermatozoides-ovocito (Souza *et al.* 2008) y como activador de la expresión de citoquinas embriotróficas que ayudan a preparar el tracto reproductivo de la hembra para el desarrollo embrionario, particularmente facilitando los cambios inmunológicos requeridos para la implantación (Robertson, 2005)

Sin embargo, las técnicas de criopreservación de semen equino abogan por la retirada del plasma seminal, ya que su presencia promueve un efecto perjudicial en la preservación de las células espermáticas (Guasti *et al.* 2012). Así mismo, se describe que los efectos benéficos del plasma seminal se dan por un corto periodo de tiempo después del contacto con los espermatozoides, por lo que no sería necesario en periodos posteriores, ya que su ausencia no parece tener efectos negativos sobre las tasas de preñez (Portus *et al.* 2005).

La composición del plasma seminal y la función secretora de las glándulas sexuales accesorias, varía entre las especies, entre individuos de una misma especie, e incluso entre eyaculados de un mismo individuo (Aurich *et al.* 1996) Las diferencias en la concentración de algunos componentes, pueden deberse a variaciones nutricionales, de manejo, temperatura ambiental, estación del año, estrés y métodos de detección (Juyena y Stelletta, 2012). La estacionalidad en los equinos, no sólo afecta la reproducción en las hembras, sino también la calidad del plasma seminal en el macho, lo cual parece deberse a los cambios en los niveles de hormonas esteroideas que se generan en las diferentes estaciones, lo cual ha sido descrito tanto en el plasma seminal como en el plasma sanguíneo (Katila y Kareskoski, 2006)

### **1.2.1 Componentes del plasma seminal equino**

#### **Proteínas**

La mayoría de las proteínas presentes en el plasma seminal se derivan del epidídimo y para la especie equina, alrededor del 73% de los compuestos proteicos son secretados en la cabeza de éste (Guasti *et al.* 2012). Estas proteínas participan en la maduración espermática post-testicular, en la cual los espermatozoides adquieren su capacidad para fecundar (capacitación) (Giesecke *et al.* 2010c).

Las proteínas epididimarias adquiridas por la membrana espermática durante el tránsito por el epidídimo, son clasificadas de acuerdo al tipo de interacción que presentan con la célula espermática. Pueden ocurrir enlaces débiles, responsables de la quiescencia de los espermatozoides; enlaces fuertes, importantes en el tracto reproductivo de la hembra y en el proceso de fertilización; modificaciones de las proteínas de la membrana espermática, para exponer u ocultar receptores; o la presencia de proteínas libres en el fluido epididimario, colaborando con la manutención del medio (Marengo, 2008).

Los espermatozoides de los mamíferos, adquieren su movilidad y capacidad fecundante gracias a interacciones secuenciales con dichas proteínas presentes en el fluido epididimario. Entre las principales se encuentran lactoferrina, clusterina, procathepsina D, proteína de transportadora de colesterol, entre otras. Se ha sugerido que algunas de estas proteínas juegan un papel importante en la función espermática, ya sea modificando la superficie o composición de la membrana del espermatozoide o contribuyendo en la preservación de la integridad celular. En la especie equina, se ha reportado que proteínas epididimarias pueden alterar las características de la membrana plasmática, a través de la acción de la clusterina, la proteína transportadora de colesterol, o mediante actividad enzimática (Udby *et al.* 2005)

Las proteínas del plasma seminal pueden dividirse en tres grupos principales: fibronectinas tipo II (Fn-2), proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs) y espermadesinas (Kareskoski y Katila, 2008).

Las proteínas del grupo Fn-2 presentan un número variable de dominios de fibronectina tipo II, e interactúan específicamente con la colina de los fosfolípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides en el momento de la eyaculación, teniendo la capacidad de unirse a la heparina. La heparina es estructuralmente similar a los glicosaminoglicanos (GAG) que se secretan en grandes cantidades en el oviducto y en los fluidos uterinos durante la fase folicular de la yegua, pareciendo mediar el proceso de la capacitación espermática por el eflujo de colesterol y de fosfolípidos (Töpfer-Petersen *et al.* 2005; Guasti *et al.* 2012).

El segundo grupo de proteínas de importancia en los equinos se representa por la sigla CRISP y se caracterizan por presentar 16 residuos de cisteína en su estructura molecular. Se dividen en CRISP-1, CRISP-2 y CRISP-3 (Guasti *et al.* 2012). La CRISP-1 se expresa a lo largo del epidídimo y se une a la superficie espermática, influyendo en la unión de los espermatozoides y el ovocito; mientras que la CRISP-2 se expresa en el testículo, el epidídimo y las glándulas vesiculares y se cree que media las interacciones entre las células de Sertolli y los espermatozoides (Giesecke *et al.* 2010c; Hamann *et al.* 2007). La mayoría de las proteínas CRISP-3 se expresan desde el epidídimo hasta el resto del tracto genital masculino, con una alta expresión en la ampolla de los conductos deferentes. En humanos y en ratones, esta proteína se expresa en pequeñas cantidades en el tracto genital pero también en las glándulas salivares y en algunas células del sistema inmune, lo cual indica que esta proteína posee una posible función moduladora inmunológica (Hamann *et al.* 2007; Leeb *et al.* 2005). A diferencia de las demás especies de mamíferos estudiadas, el equino

produce grandes cantidades de CRISP-3 en su tracto genital, representando la mayor fracción proteica del plasma seminal (cercana a 1mg/mL de plasma seminal) (Udby *et al.* 2005). Esta expresión única y específica de la especie, sugiere que esta proteína posee un papel especial en la reproducción equina, a diferencia de las otras especies mamíferas (Giesecke *et al.* 2010a). Connor (2009), cuantificó la proteína CRISP-3 en el plasma seminal de 67 equinos por medio de ELISA, encontrando un valor promedio de  $7.44 \pm 5.98$  mg/mL; un valor mínimo de 0.49mg/mL, y máximo de 25.63 mg/mL.

Las CRISPs se expresan bajo el control androgénico y se unen en la región ecuatorial, en el post-acrosoma y en la pieza intermedia de los espermatozoides, teniendo una estrecha relación con la fusión del espermatozoide al ovocito. La proteína HSP3 pertenece al grupo de las CRISP, siendo estructuralmente semejante a las proteínas de este grupo (Schambony *et al.* 1998). Se ha descrito que la proteína CRISP-1 epididimaria es importante en la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas del espermatozoide, en la interacción del esperma con la zona pelúcida del ovocito y en la fusión de ambos gametos; esta última función también se le atribuye a la proteína CRISP-2 (Cohen *et al.* 2011)

Las espermadesinas poseen de 110-113 aminoácidos en su estructura y comprenden un único dominio estabilizado por puentes disulfuro. Estas proteínas son multifuncionales y tienen la capacidad de unirse a la heparina, a inhibidores de proteasas, a fosfolípidos y a carbohidratos. Se han aislado y caracterizado ocho proteínas de bajo peso molecular (14-30 kDa) en el plasma seminal, denominándose proteínas de choque térmico del plasma seminal equino (HSP1 a HSP8). Todas las HSP se añaden a la superficie de los espermatozoides durante la eyaculación, excepto la HSP4 (Töpfer-Petersen *et al.* 2005; Guasti *et al.* 2012). La HSP7 es la espermadesina más representativa del plasma seminal equino y es secretada durante el trayecto del espermatozoide por el conducto epididimario. Ésta se une a la zona pelúcida intacta, mostrando su papel en la interacción espermatozoide-zona pelúcida (Reinert *et al.* 1996)

Macpherson *et al.* (2002) demostraron la presencia de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y de las proteínas de unión a este factor IGFBP-2 (35 kDa) y IGFBP-5 (32 kDa) en el plasma seminal equino, sugiriendo como posibles fuentes de las mismas el testículo, el epidídimo y las glándulas accesorias, aunque no se han realizado investigaciones específicas para determinar su origen en esta especie. Adicionalmente, se correlacionaron diversos parámetros de calidad seminal con el contenido de IGF-1, encontrando mayores porcentajes de movilidad y



espermatozoides con morfología normal en equinos con mayores niveles de IGF-1, y por tanto mayores tasas de concepción. Estos resultados coinciden con los encontrados en diversos estudios realizados en murinos, en los que la morfología y la movilidad espermática mejoraron tras el tratamiento exógeno con IGF-1 (Breier *et al.* 1996; Vickers *et al.* 1999). Así mismo, la movilidad espermática y el VSL fueron significativamente mayores en espermatozoides de toros tratados *in vitro* con IGF-1 ó IGF-2 (Henricks *et al.* 1998).

Adicionalmente se ha reportado que algunas proteínas del plasma seminal, pueden mejorar la penetración del espermatozoide al oocito (El-Hajj Ghaoui *et al.* 2007), promover la fagocitosis de espermatozoides muertos y la función de los polimorfonucleares, vía proteasas (Dacheux *et al.* 2003). Así mismo, se ha reportado una correlación positiva entre el contenido de proteínas totales del plasma seminal, y la congelabilidad del semen ovino (Barrios *et al.* 2000). Usuga *et al.* (2016), hallaron un efecto significativo de las proteínas totales del plasma seminal y parámetros de calidad de semen post-descongelación como MT, MP, VSL, VCL y VAP; resultados que difieren de los reportados por Guasti *et al.* (2014), quienes a pesar de encontrar un contenido por eyaculado de proteínas totales superior en caballos fértiles que en los subfértiles ( $740.8 \pm 489.6$  vs  $416.4 \pm 254.7$  mg, respectivamente), no hallaron asociación sobre los parámetros de calidad seminal evaluados. Por otro lado, se reportó que un nivel medio de proteínas totales arrojó los mejores resultados para los parámetros espermáticos de MT, MP, VE y HOS post-descongelación, probablemente debido a que un alto nivel de proteínas en el plasma seminal podría conducir a una mayor oxidación proteica, y a la consecuente reducción de la calidad del semen (Usuga *et al.* 2016)

Numerosos estudios se han realizado para evaluar el efecto de la suplementación de proteínas del plasma seminal al semen equino criopreservado. Fagundes (2003), observó que la adición de proteínas de plasma seminal autólogo, con masa molecular superior a 10 kDa al diluyente de congelación mejoró las características espermáticas post-descongelación, mientras que las proteínas con masa inferior a 10 kDa afectaron negativamente la viabilidad espermática. Estos resultados difieren con los encontrados por Pessanha *et al.* (2008), en los que el tratamiento control arrojó mejores parámetros de calidad seminal, que los obtenidos con suplementación de proteínas del plasma seminal al 10% y al 20 % (con masa superior a 10 kDa). Sin embargo, se ha reportado que la adición de proteínas al medio antes de que ocurra el choque frío, previene el daño a la membrana espermática, inhibiendo la fosforilación de residuos de tirosina (Pérez-Pé *et al.* 2002) y manteniendo la actividad de enzimas

antioxidantes y su adecuada distribución en la superficie espermática (Martí *et al.* 2008).

### **Enzimas**

La gran mayoría de las enzimas que se encuentran en el plasma seminal actúan como agentes antioxidantes, previniendo la peroxidación de lípidos de membrana por las EROs y, en consecuencia, la fragmentación de ADN de esperma (Katila y Kareskoski, 2006)

La catalasa, la superóxido-dismutasa (SOD) y el sistema glutatión peroxidasa/reductasa (GPX/GRD) son las principales enzimas con propiedades antioxidantes que se encuentran en el semen (Guasti *et al.* 2012). El plasma seminal equino presenta una alta actividad de catalasa, la cual proviene principalmente de las secreciones de la próstata (Ball *et al.* 2000)

La enzima aspartato amino-transferasa (AST) presente en el plasma seminal equino parece estar correlacionada con la movilidad de los espermatozoides. Defectos en la membrana del espermatozoide en la región de la pieza intermedia, donde se localiza la AST, conllevan a la pérdida de esta enzima, causando el bloqueo de la producción de adenosintrifosfato (ATP), responsable de la cinética de los espermatozoides (Guasti *et al.* 2012). Otros estudios corroboran este hallazgo, encontrando una correlación entre los niveles de AST y la movilidad espermática en esta especie (Colenbrander *et al.* 1992)

La enzima fosfatasa alcalina (FA) se expresa en grandes cantidades en los testículos y el epidídimo. La cuantificación de esta enzima puede usarse como marcador para diferenciar la azoospermia verdadera (altos niveles de FA) de fallas en la eyaculación (bajos niveles de FA) y de la azoospermia por bloqueo de ampolla de los conductos deferentes (Turner y McDonnell, 2003). La actividad de esta enzima, ha sido descrita en la cabeza del espermatozoide, pieza intermedia y fragmentos de la cola; se cree que participa en la regulación de la fosforilación de proteínas, mediante protein-kinasas dependientes de AMPc, necesaria para la movilidad espermática (Juyena y Stelleta, 2012).

Los niveles de  $\beta$ -glucuronidasa varían entre las diferentes fracciones del eyaculado, encontrando concentraciones más altas en la primera fracción espermática (Kareskoski *et al.* 2005). Se cree que las glucosidasas juegan un papel importante durante la maduración espermática y la fertilización, y las diferencias en sus niveles pueden ser asociadas con defectos funcionales en los espermatozoides (Corrales *et*

*al.* 2002; Días *et al.* 2004). En toros, la disminución en los niveles de glucosidasas derivadas del epidídimo o de los espermatozoides, ha sido correlacionada con baja concentración espermática y morfología anormal del esperma (Katila y Kareskoski, 2006).

La actividad de la enzima lipasa ha sido demostrada en el plasma seminal equino, disminuyendo la movilidad espermática de manera dosis dependiente (Carver y Ball 2002). Otras enzimas estudiadas en el plasma seminal de esta especie son las isoenzimas de la anhidrasa carbónica (AC-I, AC-II y AC- III), las cuales se cree que regulan la concentración de bicarbonato, y por lo tanto, el pH del plasma seminal. La actividad de la AC-I, AC-II, y AC-III ha sido detectada en las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales (Asari *et al.* 1996). La enzima convertidora de la angiotensina (ECA) se ha encontrado en las membranas plasmáticas de espermatozoides epididimarios y eyaculados. Se cree que la angiotensina II presenta alguna influencia sobre varios parámetros de la movilidad espermática, como VAP y VCL, pero no el porcentaje de espermatozoides móviles (Ball *et al.* 2003). Adicionalmente, la enzima lactato-deshidrogenasa se ha correlacionado con la movilidad, la concentración espermática y el volumen del eyaculado (Katila y Kareskoski, 2006).

Pesch *et al.* (2006) cuantificaron algunas de las enzimas descritas anteriormente en el plasma seminal de 72 equinos de diferentes razas (Tabla 1-1), encontrando una correlación positiva entre éstas y la concentración espermática; y una correlación negativa, con el volumen del eyaculado. Así mismo, hallaron una correlación positiva entre el contenido de lactato deshidrogenasa (LDH) en el plasma seminal equino y la movilidad total, la movilidad progresiva y la vitalidad del semen fresco, sugiriendo un papel importante de esta enzima en el metabolismo de las células espermáticas. Por el contrario, hubo una correlación negativa entre la LDH y el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal (Pesch *et al.* 2006). Así mismo, se ha descrito que algunas transaminasas se localizan principalmente en la pieza media del espermatozoide, mientras que la LDH se encuentra en el citosol y las mitocondrias. En porcinos, se ha reportado que la LDH podría conducir la glucólisis cuando el O<sub>2</sub> está limitado por medio de la reducción de piruvato a lactato, mediada por NADH. La actividad reducida de la LDH en el plasma seminal, podría indicar entonces alteraciones en la función y metabolismo espermático (Juyena y Stelletta, 2012).

**Tabla 1-1.** Concentración de algunas enzimas del plasma seminal equino (Adaptada de Pesch *et al.* 2006)

Enzima	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Aspartato amino transferasa - AST (IU/L)	80.0	26.0	400.0
y Glutamil transferasa- GGT (IU/L)	7500.0	1300.0	19000.0
Fosfatasa alcalina - FA (IU/L)	30200.0	344.0	62900.0
Fosfatasa ácida - AcP (IU/L)	20.0	2.0	92.0
Lactato deshidrogenasa - LDH (IU/L)	81.0	3.0	1450.0

En los seres humanos y en caninos, se ha descrito que los niveles de fosfatasa ácida (AcP) pueden ser indicadores de la función secretora de la próstata. En los equinos, esta enzima se encuentra principalmente en el cuerpo y ductos del epidídimo y en las vías deferentes (Katila y Kareskoski, 2006). Por otro lado, el origen de la enzima GGT es especie específica y se describe por primera vez un origen testicular y epididimario para la misma en la especie equina, sugiriéndose además que podría tener un papel importante en la protección de los espermatozoides contra el estrés oxidativo (Pesch *et al.* 2006)

### Hormonas

El contenido de hormonas esteroidales y de prostaglandinas en el plasma seminal, son el resultado de la secreción de las células de Leydig, el epidídimo, las vesículas seminales y la próstata, así como de los espermatozoides, ya que cuentan con la enzima aromatasa y ciclo-oxigenasa II (Hess *et al.* 2001). En equinos, la presencia de prostaglandinas (PGF2 $\alpha$ , y PGE2), estrógenos y oxitocina, está asociada con el transporte espermático y la eliminación del esperma no viable, ayudando en la limpieza uterina en yeguas susceptibles a endometritis (Troedsson *et al.* 2005). La presencia de PGF2 $\alpha$  y oxitocina en el plasma seminal está relacionada con las contracciones del miometrio, las cuales generan la remoción de líquido acumulado y productos nocivos resultantes del proceso inflamatorio ocurrido después del servicio o inseminación artificial (Guasti *et al.* 2012). Particularmente, en la especie equina las células germinativas del testículo producen grandes cantidades de estrógenos (Hess, 2003); sin embargo, su función no es muy clara (Guasti *et al.* 2012)

## Iones

La composición iónica del plasma seminal varía entre las diferentes fracciones del eyaculado, y también entre animales de la misma especie. Las concentraciones de calcio, fosfato inorgánico y magnesio son mayores en la fracción espermática, compuesta por secreciones del epidídimo y de la ampolla del conducto deferente (Kareskoski y Katila, 2008). El nivel de iones en la dieta, podría tener un efecto positivo en la concentración de los mismos en el plasma seminal. Cationes como el sodio, potasio, calcio y magnesio, ejercen un importante balance osmótico y hacen parte de numerosas enzimas (Cevik *et al.* 2007)

Las concentraciones de sodio, potasio y cloruro varían también significativamente entre reproductores equinos. El fluido pre y post-espermático contiene una mayor concentración de cloruro que la fracción espermática, mientras que no se han observado diferencias para el sodio y el potasio (Kareskoski *et al.* 2005). Adicionalmente, se ha reportado que la adición de potasio a diluyentes para semen equino y humano mejora la movilidad espermática (Katila y Kareskoski, 2006). El potasio es un inhibidor metabólico natural; se ha reportado que altas concentraciones de este ion disminuye el metabolismo espermático y por tanto, su movilidad (Massanyi *et al.* 2003). En las ovejas, el incremento de los niveles de potasio ha sido correlacionado negativamente con la movilidad progresiva espermática, mientras que ocurre lo contrario para el sodio y cloruro (Asadpour 2012).

El ion de calcio es un importante regulador de la fisiología espermática, se presenta en grandes concentraciones en los productos de secreción de la próstata, vesículas seminales y el epidídimo. Este ion es el causante de la reacción acrosómica en mamíferos y parece tener una importante implicación en la movilidad espermática (Guasti *et al.* 2012). La reacción acrosómica espontánea ha sido asociada con un incremento de las concentraciones de calcio ionizado en el plasma seminal equino (Pesch, 2005). Adicionalmente, el calcio extracelular regula la capacitación espermática (Baker *et al.* 2004) y la hiperactivación (Márquez y Suarez, 2004)

El magnesio juega un papel relevante como un cofactor en más de 300 reacciones enzimáticas que implican el metabolismo energético y la síntesis de ácidos nucleicos (Wong *et al.* 2001). Asadpour (2012) correlacionó valores más bajos de movilidad progresiva para semen de ovejas con el incremento de los niveles de calcio en el plasma seminal, y con la disminución de los niveles de magnesio y fosfato. Por el contrario, los valores de movilidad post-descongelación en semen bovino aumentó cuando se adicionó  $MgCl_2$  en el diluyente de congelación, lo que indica una variación considerable

entre los resultados obtenidos en las diferentes especies (Lapointe *et al.* 1996). Otra explicación es la posibilidad de que el efecto de los iones sobre la movilidad se altere durante el almacenamiento (Kareskoski y Katila, 2006). Jobim *et al.* 2004, reportó que el magnesio podía jugar un papel importante para la movilidad espermática; y se ha correlacionado positivamente con células viables libres de apoptosis en ovejas (Juyena, 2011).

El zinc se origina principalmente de la próstata, y juega un papel importante en la movilidad de los espermatozoides, ejerciendo una actividad antioxidante protectora. También se considera como un factor antimicrobiano para bacterias Gram negativas y Gram positivas (Barrier *et al.* 2002; Guasti *et al.* 2012). Así mismo, se ha descrito que el zinc interviene en la maduración espermática (Baldauf *et al.* 2003; Leonhard-Marek, 2001) y que cantidades fisiológicas de zinc en el plasma seminal, bloquea el influjo de calcio ionizado en las células espermáticas con el fin de evitar la reacción acrosómica prematura (Leonhard-Marek, 2001). Tanto el zinc como el hierro han sido correlacionados positivamente con la calidad seminal en equinos y bovinos (Katila y Kareskoski, 2006). El zinc juega un papel importante en la regulación de la movilidad espermática, a través del control de la utilización de energía por medio de los sistemas dependientes de ATP y de las reservas de energía fosfolipídicas (Juyena y Stelletta, 2012). En humanos, se ha descrito la influencia de este ion en el proceso de espermatogénesis, desde su contribución a la estabilización ultraestructural de la compactación de la cromatina y la modulación de algunos procesos mitocondriales, como la respiración celular y la apoptosis (Zhao *et al.* 2016). Sin embargo, los resultados son contradictorios, ya que se han encontrado niveles de zinc superiores en el plasma seminal de hombres infértiles que en hombres sanos (Akinloye *et al.* 2011).

El cobre es esencial para la funcionalidad de ciertas enzimas. La enzima Cu-Zn-superóxido dismutasa (SOD), que participa en la protección de los espermatozoides contra los radicales libres; y la enzima citocromo oxidasa, responsable del suministro de energía y de la inmunidad celular y humoral, son dependientes de iones de cobre. Sin embargo, estudios indican que altos niveles de cobre reducen algunos procesos oxidativos y la glucólisis, lo que puede conducir a la inmovilidad y la reducción de la viabilidad de los espermatozoides (Leonhard-Marek, 2001; Guasti *et al.* 2012). Sin embargo, otras investigaciones han reportado una correlación positiva entre el contenido de cobre en el plasma seminal y la movilidad espermática en búfalos (Eghbali *et al.* 2008)

Pesch *et al.* (2006) realizaron la caracterización de la composición iónica del plasma seminal de equinos de diferentes razas (Tabla 1-2), encontrando correlaciones significativas entre éstos y parámetros como el volumen y la concentración del eyaculado. Assumpção *et al.* (2005), observaron una correlación negativa de la morfología anormal espermática con la concentración de fósforo, calcio y sodio; y positiva con la concentración de potasio, en la especie bovina.

**Tabla 1-2.** Concentración de algunos iones en el plasma seminal equino (Adaptada de Pesch *et al.* 2006)

<b>Ion</b>	<b>Mediana</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>
<b>Na<sup>+</sup> (mmol/L)</b>	110.5	69.0	126.0
<b>K<sup>+</sup> (mmol/L)</b>	22.1	2.1	53.0
<b>Ca total (mmol/L)</b>	2.9	0.66	14.4
<b>Ca<sup>2+</sup> (mmol/L)</b>	1.7	0.5	8.9
<b>Mg<sup>2+</sup> (mmol/L)</b>	3.1	0.5	4.2
<b>P (mmol/L)</b>	1.1	0.4	59
<b>Cl (mmol/L)</b>	114.5	84.0	129.0
<b>Cu (µmol/L)</b>	17.8	2.0	54.4
<b>Fe (µmol/L)</b>	1.9	0	34.6
<b>Zn (µmol/L)</b>	13.2	2.1	27.2

En este estudio se describe por primera vez la presencia de hierro en el plasma seminal equino. Se conoce que el hierro se encuentra ligado principalmente a proteínas como la transferrina (producida por las células de Sertoli), la haptoglobina (producida por células de Sertoli, Leydig y células germinales) y la lactoferrina (espermatozoides y vésiculas seminales). Estas proteínas contienen hierro catalítico inactivo para evitar el exceso de procesos oxidativos (Pesch *et al.* 2006). En humanos los resultados son poco consistentes, ya que se ha reportado un contenido de hierro menor en el plasma seminal de pacientes oligoastenozoospermicos (Skandhan *et al.* 2012); mientras que altos niveles de este ion, han sido correlacionados con hombres teratozoospermicos (Marzec-Wróblewska *et al.* 2011)

### **Lípidos y carbohidratos.**

La cantidad de carbohidratos en el plasma seminal equino (después de la eliminación de la fracción en gel) es considerablemente menor que en el semen de toro. Como carbohidratos libres se encuentran el inositol y la glucosa y sólo cantidades insignificantes de fructosa y galactosa. Éste último, es el principal

carbohidrato enlazado a otras moléculas, así como la manosa y la fucosa (Katila y Kareskoski, 2006). En rumiantes, el principal azúcar presente en el plasma seminal es la fructosa (Juyena y Stelletta, 2012), la cual tiende a aumentar durante la temporada reproductiva (Matsuoka *et al.* 2006) y juega un papel importante en el metabolismo, ya que los espermatozoides utilizan la fructosa para producir ATP (Juyena y Stelletta, 2012). Los espermatozoides equinos no son eficientes en el uso anaeróbico de la fructosa (Katila y Kareskoski, 2006).

La fuente más probable de lípidos en el plasma seminal, es tanto el epidídimo como los espermatozoides, observándose una gran variabilidad entre eyaculados, siendo el primer eyaculado el más rico en contenido lipídico (Juyena y Stelletta, 2012). El colesterol es el principal esteroide en las membranas de los espermatozoides equinos, así como la colina, la etanolamina y la esfingomiélin, son los principales tipos de fosfolípidos (Katila y Kareskoski, 2006), los cuales son de gran importancia para la estructura, el metabolismo y la capacitación del espermatozoide, así como para la fertilización del ovocito (Juyena y Stelletta, 2012). En el plasma seminal equino se ha reportado una concentración total de fosfolípidos de  $28.4 \pm 20.2$   $\mu\text{moles}/100$  ml (Chow *et al.* 1986). Se conoce que la membrana plasmática del espermatozoide equino, está formada por una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados; siendo el más predominante el ácido docosopentanoico (C22: 5 n-6), que representa un  $49.9 \pm 8.7\%$  de todos los ácidos grasos, seguido por el ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0). Adicionalmente una alta proporción de este tipo de ácidos grasos, ha sido correlacionada positivamente con la calidad espermática, probablemente debido a que confieren mayor fluidez a la membrana plasmática (García *et al.* 2011), y a pesar de ser más propensos a la peroxidación lipídica, algunos de ellos presentan propiedades antioxidantes (Richard *et al.* 2008). En humanos, se ha descrito una relación del ácido esteárico del plasma seminal, con los parámetros de movilidad del semen antes y después de la congelación (Martínez-Soto *et al.* 2013)

### **Vitaminas**

En el plasma seminal se encuentran algunos antioxidantes no enzimáticos como el  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -carotenos, retinol y ascorbato, en concentraciones relativamente altas (Kandár *et al.* 2013); su contenido presenta una gran variabilidad entre los reproductores equinos y está relacionado a su consumo o administración (Williams y Carlucci, 2006).

Antioxidantes de membrana, como la Vitamina A y E tienen una función relevante en la defensa contra la peroxidación lipídica inducida por las EROs (Kandár *et al.* 2013).



La vitamina E está constituida por un grupo de 8 isómeros que incluyen tanto tocoferoles como tocotrienoles. El  $\alpha$ -tocoferol es la forma biológica más activa de la vitamina E (Yoshida *et al.* 2003). La vitamina A, incluye el retinol y los  $\beta$ -carotenos; estos últimos son precursores de la vitamina A (Kandár *et al.* 2013). En equinos, son pocos los estudios que evalúen el contenido de estas dos vitaminas en el plasma seminal. En humanos se han reportado niveles de retinol y  $\alpha$ -tocoferol en el plasma seminal significativamente menores que en el plasma sanguíneo (Hurtado de Catalfo *et al.* 2007; Kao *et al.* 2008). Los rangos fisiológicos de estas dos moléculas en el plasma seminal humano varían entre laboratorios y presentan un intervalo amplio, especialmente para el retinol (Kandár *et al.* 2013). Moretti *et al.* (2011) reportaron un rango de 2.22 a 7.06  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol en 27 pacientes. Diafouka y Gbassi (2009) encontraron una concentración promedio de  $0.62 \pm 0.40 \mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol en pacientes con parámetros espermáticos normales. Adicionalmente, se han reportado concentraciones de vitamina E en el plasma seminal humano de  $306 \pm 349 \text{ ng/mL}$  (Therond *et al.* 1996) y  $0.5 \pm 0.20 \mu\text{mol/L}$ , encontrándose en mayores cantidades en pacientes normozoospermicos que en los astenoteratozoospermicos (Nouri *et al.* 2008). Por otro lado, Omu *et al.* (1999) reportaron una concentración promedio de  $0.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$  de retinol en el plasma seminal de 40 pacientes, mientras que Pappas *et al.* (1993) no detectaron niveles de este componente.

Para la vitamina C, se han realizado mediciones en el plasma seminal de caballos árabes para las diferentes estaciones del año, encontrándose concentraciones de 1.76 mg/L (4.41 nmol/mL), 1.08 mg/L (2.71 nmol/mL), 2.05 mg/L (5.13 nmol/mL) y 0.84 mg/L (2.12 nmol/mL), para el otoño, invierno, primavera y verano, respectivamente. Adicionalmente, se ha reportado un contenido mayor de vitamina C en el plasma seminal de equinos mayores de 18 años de edad ( $4,14 \pm 0.89 \text{ nmol/mL}$ ) que en caballos jóvenes 1.1 mg/L ( $2.77 \pm 0.40 \text{ nmol/mL}$ ) (Waheed *et al.* 2013). En humanos, se ha reportado que el nivel de vitamina C en espermatozoides de pacientes astenoteratozoospermicos es dos veces mayor que en pacientes normozoospermicos (Nouri *et al.* 2008).

La vitamina A y sus metabolitos, conocidos como retinoides, son reguladores del crecimiento y diferenciación celular (Hidalgo *et al.* 2005); además esta vitamina es importante para la función y estructura normal del testículo (Hogarth y Griswold, 2010). En las células espermáticas bovinas, el 90% del total de vitamina A se encuentra en la membrana acrosomal (Gambhir y Ahluwalia, 1975). Se ha reportado una correlación positiva entre el contenido de retinol del plasma seminal y la movilidad espermática (Kao *et al.* 2008), la integridad de membrana y la morfología normal de los espermatozoides, ya que bajos niveles de vitamina A mostraron un porcentaje mayor de anomalías

en la pieza intermedia y de colas dobladas (Abdulkareema *et al.* 2005). Así mismo, se encontró que el retinol reduce significativamente el porcentaje de células espermáticas con daño en el acrosoma cuando son sometidas a condiciones de estrés calórico, lo cual se debe a que a concentraciones fisiológicas, la vitamina A estabiliza la membrana (Maya-Soriano *et al.* 2013)

Se ha observado, un efecto positivo de la adición de ácido ascórbico en la preservación de la integridad de la membrana plásmatica de espermatozoides equinos en semen refrigerado. Adicionalmente, se ha descrito que la adición de vitamina E antes de almacenar el semen a temperatura de refrigeración (5 ° C) ejerce un efecto protector sobre la membrana plasmática y mantiene la movilidad progresiva, independientemente de la presencia o ausencia de plasma seminal (Aurich *et al.* 1997). Sin embargo, Baumber *et al.* (2005) observó que la adición de  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico al diluyente de congelación, no mejoró la calidad de los espermatozoides equinos tras la descongelación; así mismo Ball *et al.* (2001b), no demostró de forma clara un efecto positivo en el mantenimiento de la movilidad de los espermatozoides ni de la fertilidad potencial durante su almacenamiento. En otro estudio realizado, se demuestra que la suplementación con altas concentraciones de ácido ascórbico para el proceso de criopreservación de semen equino, ha arrojado efectos negativos sobre la peroxidación lipídica de la membrana espermática ( $p < 0.05$ ). Por el contrario, se describe que la suplementación con  $\alpha$  – tocoferol mejoró la peroxidación lipídica de la membrana ( $p < 0.05$ ) y tuvo un efecto positivo en la integridad y la estabilidad de la membrana espermática post-descongelación. (Vasconcelos *et al.* 2013).

### **1.2.2 El plasma seminal en la criopreservación de semen equino**

La remoción del plasma seminal durante la criopreservación, favorece el estrés oxidativo del semen equino, ya que la mayoría de su capacidad antioxidante se encuentra allí, de manera que las técnicas estándar de criopreservación producen un descenso en la actividad de algunas enzimas como la catalasa y la GPx (Ball, 2008). Con el fin de contrarrestar este efecto, se han desarrollado diversas investigaciones en las que se ha suplementado con diferentes niveles de plasma seminal. Almeida y Ball (2006) evaluaron diferentes concentraciones de plasma seminal (0%, 5%, 25% y 50%) en la protección contra el estrés oxidativo y el daño a los espermatozoides equinos criopreservados, y concluyeron que la adición de plasma seminal antes de la

congelación protege contra la peroxidación lipídica durante este proceso. Sin embargo, cuando se usa en concentraciones superiores a 25% conduce a una disminución en la viabilidad de los espermatozoides, lo que sugiere que sólo bajos niveles de plasma seminal son esenciales para el mantenimiento de la calidad del esperma. Estos resultados coinciden con los encontrados por Pizarro *et al.* (2013), en los que se describe una reducción de la peroxidación lipídica del semen equino criopreservado suplementado con 10% y 20% de plasma seminal. Katila *et al.* (2002), encontraron que puede lograrse un mayor porcentaje de espermatozoides equinos móviles después de la criopreservación, cuando se conserva un 20% del plasma seminal. Por otro lado, Alghamdi *et al.* (2002), demostraron que la adición de plasma seminal en concentraciones reducidas (menores al 5%) mejora la calidad del semen descongelado, ocurriendo todo lo contrario cuando se retira por completo o con la adición de altas concentraciones (10-30%). Moore *et al.* (2005b), indicaron que la incubación de los espermatozoides equinos con 5% de plasma seminal resultó en mayores porcentajes de espermatozoides móviles después de la criopreservación (42%), que cuando se incubaron con 20% de plasma seminal (35%,  $p < 0.05$ ) durante un mínimo de 2 horas antes de la congelación. Adicionalmente, algunos estudios han reportado que la adición de plasma seminal de sementales de alta congelabilidad al semen de animales de congelabilidad baja, mejora la resistencia de los espermatozoides al proceso de congelación y descongelación; lo contrario ocurre cuando se añade plasma seminal de sementales de congelabilidad baja. Este trabajo demuestra que la variabilidad individual en la composición del plasma seminal es uno de los factores que determinan la congelabilidad del semen equino (Aurich *et al.* 1996).

Otras investigaciones han evaluado el efecto de la adición de plasma seminal en el semen descongelado para evitar procesos deletéreos en los espermatozoides como la criocapacitación y mejorar algunos parámetros de calidad seminal. Se ha demostrado en espermatozoides ovinos que el plasma seminal limita el desarrollo de la capacitación post-descongelación (Mortimer y Maxwell, 2004). Maxwell *et al.* (1999), publicaron que la re-suspensión de los espermatozoides tras su descongelación en solución tampón fosfato (PBS) con un 20% de plasma seminal mejora la movilidad espermática, retrasa los cambios similares a la capacitación y por consiguiente la reacción acrosómica, y además, aumenta la integridad de membrana permitiendo incrementar la fertilidad después de la inseminación artificial cervical. Estos resultados demuestran que los daños funcionales de los espermatozoides durante la criopreservación pueden ser evitados mediante la adición de plasma seminal, probablemente a través del efecto de descapacitación combinado con la mejora en el transporte espermático. Por el contrario,

Lozino *et al.* (2011), no encontraron diferencia significativa en los parámetros de calidad seminal al resuspender el semen descongelado en el plasma seminal de caballos de tiro.

La adición de plasma seminal o de sus componentes al semen descongelado, aumenta el consumo de oxígeno y la movilidad de los espermatozoides (Juyena y Stelletta, 2014), interviene en la recuperación de algunas proteínas de la superficie espermática (Domínguez *et al.* 2008), revierte el criodañó sobre la membrana espermática de espermatozoides ovinos (Rebolledo *et al.* 2007) e incrementa en general, los parámetros de calidad espermática (Maxwell *et al.* 2007).

Por otro lado, se ha descrito que la separación total del plasma seminal en la preparación del semen para la criopreservación, aumenta la duración de la respuesta inflamatoria del útero de las yeguas después de la inseminación con semen descongelado. De manera contraria, la presencia de plasma seminal en la dosis inseminante acorta la duración de la inflamación inducida por la inseminación artificial (Troedsson *et al.* 2000).

### **1.3 Capacidad antioxidante del semen equino**

Un antioxidante con función biológica se define como una sustancia que retrasa, disminuye o evita la oxidación del sustrato, resultando ser un agente reductor más potente (Membrillo *et al.* 2003; Halliwell, 2007). La actividad antioxidante puede ser eficaz de diversas maneras: inhibiendo las reacciones de oxidación de radicales libres, interrumpiendo la propagación de la reacción en cadena de la auto-oxidación, mediante la sinergia con otros antioxidantes, como agentes reductores que convierten los hidroperóxidos en compuestos estables, como quelantes metálicos que convierten pro-oxidantes metálicos (hierro y derivados de cobre) en productos estables, y finalmente como inhibidores de las enzimas pro-oxidativas (lipooxigenasas) (Pokorný, 2007; Kancheva, 2009; Caroho y Ferreira, 2013). Sin embargo, los antioxidantes pueden retardar la peroxidación, aunque nunca la detienen completamente (Rodríguez *et al.* 2007).

Los mecanismos de defensa antioxidante en los seres vivos, pueden ser mediados por proteínas de unión a hierro y cobre, tales como la transferrina, la ferritina y la albúmina (Kirschvink *et al.* 2008). También por pequeñas moléculas antioxidantes como el ascorbato, el urato, el glutatión, los tocoferoles, los flavonoides, los carotenoides y el

ubiquinol; y por enzimas, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx) (Caroho y Ferreira, 2013). Éstas son las principales enzimas presentes en el plasma seminal equino, encargadas de proteger a los espermatozoides del daño oxidativo causado por la producción de EROs (Juyena y Stelletta, 2014). De esta manera, el sistema antioxidante de los seres vivos está compuesto por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Caroho y Ferreira, 2013). El plasma seminal es el fluido biológico que contiene la mayor concentración de antioxidantes, incluyendo el plasma sanguíneo, lo cual compensa el déficit de enzimas antioxidantes en el citoplasma del espermatozoide (Juyena y Stelletta, 2014).

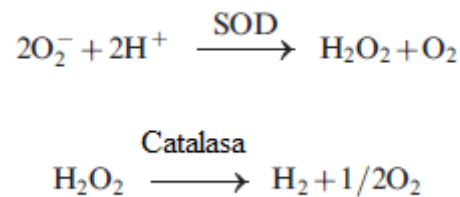
Los espermatozoides equinos generan EROs en forma natural, principalmente por su metabolismo mitocondrial, y por la enzima espermatozoide específica NADPH oxidasa (NOX5), presente en la membrana plasmática de la cabeza de esta célula (Sabeur y Ball, 2007). La producción de EROs ha sido considerada como un mecanismo fisiológico, ya que promueve la capacitación y la fosforilación de la tirosina (Baumber *et al.* 2003), implicada en la vía de señalización que controla procesos como la capacitación y la reacción del acrosoma. Por esta razón se plantea que son necesarias pequeñas cantidades de EROs para la función espermática normal, incluyendo los procesos anteriormente mencionados, la hiperactivación, la fusión al oocito, la fertilización (Chi *et al.* 2008) y la estabilización de la cápsula mitocondrial en la pieza media (Gonçalves *et al.* 2010); sin embargo, la producción excesiva de las mismas es altamente tóxica para los espermatozoides (Ball, 2008; Katila y Kareskoski, 2006), debido fundamentalmente a que la capacidad antioxidante del organismo es rebasada, y por lo tanto es incapaz de inactivar las EROs (Caroho y Ferreira, 2013).

### **1.3.1 Antioxidantes enzimáticos**

En cuanto a los antioxidantes enzimáticos, la catalasa es un enzima epididimaria que protege al espermatozoide del daño oxidativo en el lumen del epidídimo; mientras que la SOD y la GPx son secretadas por las vesículas seminales y protegen a las células espermáticas después de la eyaculación (Zubkova y Robaire, 2004). La localización de la SOD en el acrosoma, post-acrosoma y cola del espermatozoide; de la GPx en el post-acrosoma y parte apical de la cabeza; y de la glutatión reductasa (GRD) en la cola, ha sido demostrada (Martí *et al.* 2008).

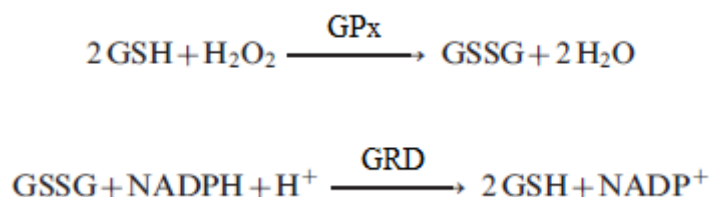
De las tres isoenzimas de la SOD (CuZn-SOD, Mn-SOD, y la [EC]-SOD extracelular), la actividad de la CuZn-SOD en el plasma seminal es alta, mientras que la de Mn-SOD y EC-SOD es muy baja (Eghbali *et al.* 2008). La enzima SOD convierte espontáneamente  $O_2^-$  en  $O_2$  y  $H_2O_2$  (este último actúa como sustrato de la catalasa); mientras que la catalasa convierte  $H_2O_2$  en  $O_2$  y  $H_2O$  (Rahman, 2007) (Figura 1-1).

**Figura 1-1.** Acción de la enzima SOD y catalasa (Adaptada de Álvarez *et al.* 1987)



El plasma seminal contiene una concentración relativamente alta de glutatión reducido (GSH), el cual es el sustrato de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) selenio (Se) dependiente (principal enzima encargada de remover el peróxido de hidrógeno); y de la enzima glutatión transferasa (encargada de catalizar reacciones covalentes entre el glutatión con sustancias electrofílicas). El glutatión actúa como un donador de electrones y puede reaccionar directamente (a través de su grupo tiol), con peróxido de hidrógeno, anión superóxido y radicales hidroxilos; y su grupo sulfidrilo, puede reaccionar con radicales alcoxi e hidroperóxidos (Lenzi *et al.* 1996). La enzima glutatión reductasa (GRD) regenera GSH del glutatión oxidado (GSSG). La ecuación de equilibrio que involucra a ambos compuestos se describe en la figura 1-2.

**Figura 1-2.** Acción de la enzima GPx y GRD (Adaptada de Calvin *et al.* 1981)



Adicional a su acción antioxidante, el glutatión participa en el desdoblamiento de la fructosa por parte del espermatozoide, promoviendo su actividad metabólica y movilidad (Juyena y Stelletta, 2014). De Oliveira *et al.* (2013), suplementaron el diluyente de congelación para semen equino con glutatión (2.5 mM) y observaron un incremento post-descongelación de la viabilidad, la movilidad progresiva y la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides.

Se ha reportado para el plasma seminal equino, actividades de catalasa de  $98.7 \pm 29.2$  U/mg de proteína; de SOD de  $29.15 \pm 6.64$  U/mg proteína; y de GPx de  $0.87 \pm 0.06$   $\mu$ M de NADPH oxidado/min/mg de proteína (Ball *et al.* 2000; Baumber y Ball, 2005). En un estudio realizado con equinos de la raza Criollo Colombiano, se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y SOD en sangre y plasma seminal, sin encontrarse una correlación entre la actividad de las enzimas estudiadas en el plasma seminal con la actividad sanguínea, sugiriendo que ambos sistemas son sistemas antioxidantes independientes. Sin embargo la actividad de la GPx en plasma seminal se correlacionó significativamente con la concentración espermática. Así mismo la GPx en sangre se correlacionó con el porcentaje de espermatozoides con movimiento individual progresivo y con el porcentaje de espermatozoides normales (Villa *et al.* 2011). Por otro lado, se ha observado una mayor actividad de GRD, GPx, SOD y catalasa en semen de baja calidad durante la temporada no reproductiva, posiblemente debido a que la defensa antioxidante del plasma seminal se acentúa en condiciones adversas, para garantizar la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Cardozo *et al.* 2006). Adicionalmente, se ha reportado un descenso en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, GPx y del GSH en el semen descongelado cuando se compara con el semen fresco de búfalos. Así mismo se describe una asociación positiva de estas enzimas con la movilidad e integridad de membrana espermática; y negativa con la peroxidación lipídica y la producción de EROs (Kadirve *et al.* 2014). Vasconcelos *et al.* (2013) reportaron que la concentración y la actividad de la GPx en el plasma seminal fueron mayores en caballos de alta fertilidad que en los de baja fertilidad; mientras que para la catalasa fueron menores.

La actividad antioxidante enzimática en el semen equino es incrementada con la adición de un diluyente, posiblemente por sus cofactores y sustancias adicionales (Kankofer *et al.* 2005). Se ha descrito que la catalasa previene el descenso en la movilidad después del estrés oxidativo (Baumber *et al.* 2000). Un efecto protector de la catalasa y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sobre la fragmentación del ADN, ha sido observado en espermatozoides humanos (Chi *et al.* 2008). Para los espermatozoides equinos el daño en el ADN puede ser bloqueado igualmente por la presencia de catalasa y de glutatión reducido (GSH), pero no por la presencia de SOD. Esto reitera que el peróxido de hidrógeno es la principal ERO responsable del daño en el ADN de estas células (Baumber *et al.* 2003).

### 1.3.2 Antioxidantes no enzimáticos

Algunas moléculas de origen no enzimático presentes en el plasma seminal, como vitamina E, vitamina C, vitamina A, cofactores enzimáticos, uratos, albúmina, taurina, hipotaurina, piruvato y lactato, pueden actuar como antioxidantes (Ball *et al.* 2000; Baumber *et al.* 2000; Carocho y Ferreira, 2013).

Un sistema celular importante de protección contra el daño oxidativo en el semen es el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E). Este antioxidante es una molécula pequeña cuya función consiste en romper la cadena de producción de EROs, más que eliminarlos, lo cual conlleva a la neutralización de los radicales lipídicos, ofreciendo protección de los componentes de la membrana sin influir en la generación de EROs. La capacidad del  $\alpha$ -tocoferol para mantener una tasa estacionaria o equilibrada de reducción del radical peroxilo en la membrana plasmática, depende del reciclaje de  $\alpha$ -tocoferol por agentes reductores externos tales como ascorbato o tioles (Vasconcelos *et al.* 2013). Debido a que este antioxidante no es sintetizado por las células mamíferas, una vez que el tocoferol de la membrana ha sido consumido durante períodos de estrés oxidativo, los lípidos de la célula quedan sujetos al proceso de peroxidación, lo cual puede conducir a daños citotóxicos (Zhang *et al.* 2001).

La actividad antioxidante de los tocoferoles está basada en el sistema redox tocoferol-tocoferilquinona. Son secuestradores de radicales libres y de radicales peróxidos. Se ha sugerido que la larga cadena de titilo permite al tocoferol repartirse entre las membranas lipofílicas de células y orgánulos, donde ejercerían su actividad antioxidante, evitando el daño oxidativo (Maestro y Borja, 1993). Al donar su hidrógeno fenólico de los radicales peroxilo, forma radicales tocoferoxilo que, a pesar de ser también radicales, no son reactivos y son incapaces de continuar la reacción oxidativa en cadena (Carocho y Ferreira, 2013). Existe una variedad de isoformas naturales de los tocoferoles. Los ésteres de tocoferol (principalmente acetato o succinato) presentan una gran estabilidad y solubilidad en el agua, cuando se les compara con el tocoferol solo. Particularmente el succinato de DL- $\alpha$ -tocoferol, tiene la habilidad de acumularse dentro de la mitocondria y liberar gradualmente tocoferol a la membrana interna mitocondrial (Fariss *et al.* 2001). Debido a que la mitocondria es una de las principales fuentes de EROs, la acción de este compuesto puede ser de gran importancia para la reducción del estrés oxidativo. Algunos resultados por ejemplo, han demostrado que el DL- $\alpha$ -tocopherol-succinato es efectivo en la prevención de la peroxidación lipídica de espermatozoides equinos durante periodos cortos de incubación (Almeida y Ball, 2005).



Se cree que la vitamina E es el principal componente de la defensa antioxidante del espermatozoide y es considerado como uno de los mayores protectores del daño de la peroxidación lipídica a la membrana plasmática (Contri *et al.* 2011), al eliminar radicales peroxilo (ROO•), alcoxi (RO•) y otros radicales derivados de lípidos (Silva, 2006). Investigaciones en la especie equina, bovina y canina, han reportado un efecto benéfico de la suplementación de  $\alpha$ -tocoferol en la integridad y estabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides (Agüero *et al.* 1995; O'Flaherty *et al.* 1997; Hatamoto *et al.* 2006; Vasconcelos *et al.* 2013), así mismo se ha descrito que la administración de vitamina E mejora la vitalidad, la integridad de membrana y disminuye la pérdida de movilidad espermática después de 48 horas de refrigeración del semen (Bansal y Bilaspuri, 2011); otros estudios no han arrojado resultados consistentes que demuestren el efecto de la Vitamina E en el mejoramiento de la fertilidad seminal (Yousefian *et al.* 2014). Lo anterior puede deberse a que se ha descrito un efecto pro-oxidante del  $\alpha$ -tocoferol en altas concentraciones, debido a su mecanismo antioxidante. Cuando éste reacciona con un radical libre, se convierte en un radical en sí mismo; al no haber suficiente ácido ascórbico para su regeneración, podría permanecer en un estado altamente reactivo y promover la auto-oxidación del ácido linoleico (Carocho y Ferreira, 2013).

El ácido ascórbico (vitamina C) es también un eliminador de EROs de origen natural, y como tal, su presencia ayuda en los procesos de disminución de numerosos radicales libres perjudiciales, incluyendo la peroxidación lipídica (Vasconcelos *et al.* 2013); siendo eficaz para eliminar los radicales superóxido, hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y el oxígeno singlete (Barros *et al.* 2011). Entre sus propiedades químicas sobresale su fuerte poder reductor, es decir, la facilidad con que se oxida reversiblemente a ácido dehidroascórbico (Maestro y Borja, 1993). Song *et al.* (2006) reportaron que pacientes con bajos niveles de ácido ascórbico en el plasma seminal, tuvieron un incremento en el daño del ADN espermático. Sin embargo, se ha reportado que el nivel de ácido ascórbico en el plasma seminal es menor en equinos de alta fertilidad y que está asociado con mejores parámetros de calidad del semen post-descongelación (Waheed *et al.* 2013; Usuga *et al.* 2016). Adicionalmente, se ha observado que la suplementación con ácido ascórbico en el diluyente de congelación no tiene un efecto positivo en la calidad post-descongelación del semen equino (Vasconcelos *et al.* 2013), ni en el mantenimiento de la movilidad del semen refrigerado durante 96 horas (Aurich *et al.* 1997; Ball *et al.* 2001a). En la especie canina, Michael *et al.* (2008) reportaron que la suplementación con vitamina C no mostró una influencia positiva sobre la calidad del semen preservado a 4 °C, ni sobre la inhibición en la producción de ERO; por el

contrario, afectó la movilidad espermática. Por otro lado, una concentración de 2.5 mM de vitamina C tuvo un efecto perjudicial en la movilidad post-descongelación del semen bovino (Foote *et al.* 2002), mientras que una concentración de 5 mM tuvo un efecto protector en la peroxidación lipídica del semen de toros de alta congelabilidad (Beconi *et al.* 1993). Estos resultados poco consistentes, pueden deberse a que la vitamina C puede actuar como un pro-oxidante. En presencia de metales de transición, la vitamina C genera que algunos radicales se tornen más reactivos y destructivos, produciendo por consiguiente, más radicales libres (Vasconcelos *et al.* 2013). Esto pasa cuando se combina con hierro y cobre, reduciendo  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  o  $Cu^{3+}$  a  $Cu^{2+}$ , que a su vez reduce el peróxido de hidrógeno a radicales hidroxilo (Carocho y Ferreira, 2013). Adicionalmente, tiene la habilidad de promover la liberación de dichos metales de transición desde las proteínas, exacerbando este efecto (Michael *et al.* 2008). El ácido ascórbico por sí solo no puede eliminar los radicales lipofílicos en el compartimento lipídico de los espermatozoides, pero puede reaccionar sinérgicamente con el  $\alpha$ -tocoferol para reducir los radicales lipídicos por reacción con los radicales tocoferoxilo y regenerar el  $\alpha$ -tocoferol activo (Linster y Van-Schaftingen, 2007).

La vitamina A o retinol, es un carotenoide que resulta del desdoblamiento del  $\beta$ -caroteno en el hígado. Lo que le confiere su actividad antioxidante es la habilidad de reaccionar con radicales peroxilo antes de que éstos propaguen la peroxidación lipídica (Carocho y Ferreira, 2013). El oxígeno singlete es atrapado muy fuertemente por el  $\beta$ -caroteno (Maestro y Borja, 1993). Sin embargo, también se ha propuesto que los carotenoides pueden tener efectos prooxidantes especialmente a través de la autoxidación en presencia de altas concentraciones de radicales hidroxilo formadores de oxígeno (Carocho y Ferreira, 2013).

Entre los antioxidantes no enzimáticos, la coenzima Q10, es un compuesto que está presente en todas las células y membranas y que desempeña un papel importante en la cadena respiratoria y en el metabolismo celular. La coenzima Q10 actúa previniendo la formación de radicales de peroxilo y se ha reportado que puede neutralizar estos radicales incluso después de su formación (Turunen *et al.* 2004). La coenzima Q10 ha sido identificada como un compuesto orgánico lipofílico natural que previene el estrés oxidativo en los espermatozoides; está presente en las mitocondrias de los espermatozoides y en el plasma seminal y su adición al semen ha dado buenos resultados en la prevención de la infertilidad masculina (Balercia *et al.* 2004). Se produce en tres estados redox: ubiquinona, ubisemiquinona y ubiquinol, que le permiten actuar tanto como antioxidante como pro-oxidante. Como antioxidante, interfiere con el inicio y

la propagación de la peroxidación lipídica, e indirectamente mediante la regeneración de la forma antioxidante de la vitamina E (Bentinger *et al.* 2007). Sin embargo, los resultados para el semen equino son poco consistentes, ya que se han realizado estudios en los que se suplementa el semen con coenzima Q10 y vitamina E durante los procesos de refrigeración y congelación, sin obtener resultados positivos (Rossi *et al.* 2016); mientras que otras investigaciones reportan un aumento de la movilidad espermática y disminución de la peroxidación lipídica cuando se adicionan durante la refrigeración del semen a 48 horas y 72 horas (Yousefian *et al.* 2014; Nogueira *et al.* 2015).

El ácido úrico es un componente fisiológico del plasma seminal, no sólo en humanos, sino también en especies como la bovina, ovina y porcina, en las que el metabolismo de las purinas en el organismo no culmina normalmente en ácido úrico (Buonaguidi *et al.* 1991). Se conoce que previene la sobreproducción de oxidantes oxo-hemo que resultan de la reacción de la hemoglobina con peróxidos. Por otra parte, también previene la lisis de eritrocitos por peroxidación y es un potente eliminador del oxígeno singlete y radicales hidroxilo (Carocho y Ferreira, 2013). En equinos, se ha reportado que la concentración de ácido úrico en el plasma seminal es mayor en caballos de alta fertilidad, cuando se compara con los de baja fertilidad (Waheed *et al.* 2013).

En cuanto a algunos minerales traza, iones como el zinc (Zn), el selenio (Se), el cobre (Cu), y el manganeso (Mn), a pesar de no interactuar directamente con los radicales libres, son indispensables para el funcionamiento correcto de la mayoría de enzimas antioxidantes (Tabassum *et al.* 2010). El zinc es además un inhibidor de la NADPH oxidasa, la cual cataliza la producción del oxígeno singlete a partir del oxígeno, usando la NADPH como donador de electrones; e induce la producción de metalotioneína que es un eliminador del radical hidroxilo (Prasad *et al.* 2004). El zinc está presente en altas concentraciones en el plasma seminal, influye en la fluidez de los lípidos y por consiguiente, en la estabilidad de las membranas biológicas (Zhao *et al.* 2016); afecta la estabilidad de la cromatina espermática (Björndahl y Kvist, 2010), participa en la regulación de procesos como la capacitación y la reacción acrosómica (Michailov *et al.* 2014) y está presente en concentraciones más altas en el plasma seminal de hombres sanos, comparados a hombres infértiles (Zhao *et al.* 2016). Por otro lado, el manganeso (Mn) mejora la movilidad y viabilidad espermática, la capacitación y la reacción acrosómica al disminuir el estrés oxidativo (Bansal y Bilaspuri, 2008). La adición extracelular de  $Mn^{2+}$ , aumenta el nivel de AMPc mediante la estimulación de ATPasas

de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , que permite la apertura de canales de calcio, promoviendo la reacción acrosómica (Kim y Parthasarathy, 1998).

Aminoácidos como la cisteína, que contiene un grupo tiol, es precursor del glutatión intracelular; se ha demostrado que penetra la membrana celular fácilmente y promueve la biosíntesis de GSH, protegiendo a los lípidos y proteínas de la membrana, debido a la inactivación indirecta de radicales libres (Bansal y Bilaspuri, 2011). La cisteína tiene un efecto crioprotector sobre la integridad funcional del axonema y de la mitocondria del espermatozoide, promoviendo la movilidad espermática post-descongelación. Además de mantener la movilidad, tioles como el glutatión y la cisteína, mejoran la viabilidad y la integridad de la membrana espermática de espermatozoides sometidos a criopreservación (Uysal y Bucak, 2007). Otros aminoácidos como la taurina, presenta propiedades antioxidantes al elevar el nivel de catalasa, la cual está estrechamente relacionada con la concentración de SOD en espermatozoides bovinos, ovinos y de conejos (Reddy *et al.* 2010)

### **1.3.3 Capacidad antioxidante total (CAT) del plasma seminal**

El poder antioxidante de los fluidos biológicos puede ser evaluado ya sea por cuantificación de antioxidantes individuales o por la evaluación de su acción acumulativa y efecto sinérgico. El concepto posterior se conoce como la capacidad antioxidante total (CAT) (Mehrotra *et al.* 2013). El plasma seminal contiene una gran variedad de componentes químicos con propiedades antioxidantes, de origen enzimático y no enzimático, que juntos determinan su CAT (Barranco *et al.* 2015), la cual puede dar información biológicamente más relevante, que la obtenida a partir de la medición de concentraciones de antioxidantes individuales (Ghiselli *et al.* 2000).

La medición de la CAT se ha convertido en una herramienta confiable, precisa y sencilla como método diagnóstico en la evaluación y seguimiento de la fertilidad en humanos (Mahfouz *et al.* 2009), ya que la medición de los antioxidantes individuales es más costosa y dispendiosa, debido a la diferente naturaleza y niveles de los diversos compuestos antioxidantes (Lahnsteiner *et al.* 2010). Numerosas investigaciones en el plasma seminal humano, han demostrado que la CAT es menor en pacientes infértiles y con parámetros de calidad seminal anormales o inferiores (Pahune *et al.* 2013; Eroglu *et al.* 2014; Khosravi *et al.* 2014; Fazeli y Salimi, 2016). En general, estos estudios

indican que muestras seminales con baja CAT generan excesivas cantidades de EROs, permitiendo la peroxidación lipídica y por tanto la disminución de la calidad y la funcionalidad de los espermatozoides (Barranco *et al.* 2015)

Entre los métodos más utilizados para la evaluación de la CAT en plantas, alimentos y fluidos corporales, están los ensayos FRAP (poder reductor férrico), ORAC (capacidad atrapadora de radicales oxígeno) y ABTS (decoloración del radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>) (Fingerova *et al.* 2007), los cuales permiten la evaluación de la acción antioxidante mediante diferentes mecanismos (Prior *et al.* 2005). Wnuk *et al.* (2010), encontraron mediante la metodología ABTS, una correlación negativa entre la CAT del plasma seminal equino y el daño del ADN de los espermatozoides. Por otro lado, Restrepo *et al.* (2015) reportaron valores promedios de CAT para el plasma seminal equino de 4049.4  $\mu\text{mol Trolox/L}$ , 347.8  $\mu\text{mol Trolox equivalente/L}$  y 23,9 mg de ácido ascórbico equivalente/L, mediante el ensayo ORAC, ABTS y FRAP respectivamente. En este estudio se encontró un efecto significativo de los niveles de ORAC sobre la movilidad y la morfología espermática.

El nivel de CAT del plasma seminal es más alto que el del plasma sanguíneo (Fingerova *et al.* 2007) y se ha determinado que tiene una gran variabilidad entre animales de una misma especie (Gürler *et al.* 2015) e incluso entre eyaculados de un mismo animal (Barranco *et al.* 2015). En la especie porcina, se ha encontrado variación de valores de CAT del plasma seminal en las diferentes fracciones de un mismo eyaculado, y se ha correlacionado con la congelabilidad del semen. Se demostró que muestras seminales con una CAT alta, experimentan un menor estrés oxidativo durante la criopreservación, resultado en una mayor viabilidad, movilidad e integridad de la membrana espermática post-descongelación (Barranco *et al.* 2015). Sin embargo, se ha sugerido que el efecto protector de la CAT del plasma seminal, no sucede durante el proceso de congelación en sí, ya que el plasma seminal es retirado previamente (Alkmin *et al.* 2014); sino, en el tiempo que transcurre entre la eyaculación y la congelación, cuando los espermatozoides permanecen suspendidos en el plasma seminal (Barranco *et al.* 2015).

En la especie bovina, se han realizado mediciones de la CAT del plasma seminal y se ha correlacionado positivamente con la actividad de la enzima SOD, pero no de la GPx (Calisici *et al.* 2008); por el contrario Gürler *et al.* (2015), no encontraron relación entre los niveles de CAT con la concentración de SOD y GPx, pero si fueron correlacionados negativamente con la peroxidación lipídica. En ovinos, se ha evaluado el efecto de la suplementación de algunos antioxidantes sobre la CAT y la calidad post-descongelación del semen (Yildiz *et al.* 2015).

## 1.4 Marcadores moleculares asociados a la fertilidad del macho equino

Actualmente, se conocen más de 200 genes que están implicados en la producción de células espermáticas fértiles. Las investigaciones realizadas sobre el genoma de los mamíferos han sido de gran ayuda para el estudio de estos genes en diferentes especies. Además se ha logrado un gran avance en el estudio de las mutaciones genéticas que conducen a la infertilidad en el macho. Según estudios realizados en humanos y ratones, se cree que muchos de los genes implicados en la determinación del sexo, el desarrollo testicular, la espermatogénesis y otros procesos reproductivos en equinos, se encuentran en el cromosoma Y de esta especie (Cederroth *et al.* 2007; Wilhelm *et al.* 2007). Actualmente se dispone de un mapa físico detallado de esta estructura, el cual representa el mapa del cromosoma Y más completo dentro de todas las especies de mamíferos, después de la especie humana y murina (Raudsepp *et al.* 2004, 2007).

Para ser considerados como marcadores genéticos, los genes candidatos, pueden ser identificados a través de su participación en procesos claves dentro de la reproducción de los equinos y otras especies. Los genes candidatos pueden ser analizados mediante el empleo de análisis de asociación y correlación de marcadores genéticos. Tanto los SNPs como los microsatélites, son marcadores adecuados para obtener una aproximación de dichos genes (Giesecke *et al.* 2010c). Algunas estimaciones de heredabilidad para la fertilidad en machos equinos, oscilan entre 0.004 y 0.15 (Hamann *et al.* 2007)

Giesecke *et al.* (2010c) compararon la similitud de los ARNm de 37 genes candidatos publicados, entre la secuencia genómica del equino, el humano y el ratón. Los resultados de similitud encontrados fueron en promedio de 78,7% entre los humanos y el caballo y de un 71,6% entre el caballo y el ARNm del ratón. Debido a que los resultados muestran una alta homología para la mayoría de genes candidatos elegidos, los resultados de estudios realizados en humanos y murinos pueden ser usados como referencia para análisis genéticos en equinos, incluyendo potenciales genes candidatos para fertilidad equina.

Zaabal y Ahmed (2010), investigaron cinco locus de proteínas séricas en caballos árabes, los cuales fueron usados como marcadores genéticos, incluyendo la albúmina, la transferina, la estrasa, la fosfatasa alcalina y la proteína de unión a la vitamina D,

encontrando asociación significativa entre la fertilidad y genes como la estreaa, compuesta por dos alelos autosómicos, G Y H, siendo el alelo G predominante en caballos fértiles y el alelo H en caballos infértiles.

### **1.4.1 Marcadores genéticos asociados a hormonas reproductivas**

Los genes que codifican para las hormonas implicadas en la regulación del desarrollo testicular, la madurez y la actividad sexual, son genes candidatos para la asociación de la fertilidad en equinos. La función testicular depende del eje hipotálamico-hipófisiario-testicular, lo que implica a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH), la testosterona, los estrógenos y las inhibinas (Giesecke *et al.* 2010c).

El receptor de andrógenos (RA) es un factor de transcripción ligando-dependiente que pertenece a la familia de receptores esteroidales clase 1 (Callewaert *et al.* 2003). En los equinos, el RA se localiza en el epidídimo y las células prostáticas, que están reguladas directamente por los andrógenos (Hejmej *et al.* 2006). Parlevliet *et al.* (2006) detectaron RA en las principales células del epidídimo de caballos de diferentes edades y concluyeron que el RA y los principales andrógenos son necesarios para el desarrollo y función epididimaria. En humanos, la longitud de la repetición de las bases CAG en el exón 1 del gen RA se ha asociado con infertilidad (Shah *et al.* 2003). Cualquier mutación funcional en el gen RA, podría interrumpir la señalización de la testosterona y conducir a la expresión de características sexuales secundarias femeninas (Li-hong *et al.* 2010). A pesar de que estas mutaciones no inhiben el desarrollo testicular, podría alterarse su descenso desde la cavidad abdominal (Mishra *et al.* 2013)

Se ha identificado un aumento de las concentraciones testiculares de estradiol y de estrógenos conjugados en equinos con el incremento de la edad. En caballos infértiles se han detectado concentraciones plasmáticas más bajas de estos compuestos que en caballos fértiles (Giesecke *et al.* 2010c). El receptor de estrógenos ESR2 está localizado principalmente en células del epidídimo de equinos de cualquier edad, mientras que la expresión del receptor ESR1 es localizada y dependiente de la edad (Parlevliet *et al.* 2006). Estudios en humanos, han demostrado varios sitios polimórficos en los dos genes que codifican para los receptores ESR1 y ESR2, los cuales tienen una influencia sobre la concentración espermática y la criptorquidia (Krausz y Giachini, 2007).

El gen que codifica para la relaxina (RLN) y tres genes no-alélicos de relaxina (RLN1, RLN2 y RLN3) pertenecen a la familia del gen de la insulina (Giesecke *et al.* 2010c). La relaxina desempeña un papel importante en el desarrollo del tracto reproductivo, el crecimiento de la glándula prostática y la movilidad del espermatozoide (Samuel *et al.* 2003). La próstata es la principal fuente de relaxina en el plasma seminal (Giesecke *et al.* 2010c). En la especie bovina, se ha encontrado una asociación del gen de relaxina, con la movilidad espermática, la capacitación y la reacción acrosómica del semen fresco y criopreservado, considerándose como un gen candidato de fertilidad en toros (Miah *et al.* 2011)

La GnRH es liberada por el hipotálamo de forma pulsátil, activando un receptor acoplado a proteína G (GNRHR), que induce la liberación de LH y FSH en la hipófisis anterior. La FSH es esencial para la espermatogénesis durante la pubertad, mientras que la espermatogénesis en el animal adulto es promovida principalmente por la testosterona. La liberación de testosterona y estrógenos por parte de las células de Leydig en el testículo se da gracias a la liberación de LH. La FSH se une principalmente a las células de Sertoli y provoca la liberación de inhibina, activina y de proteína de unión a andrógenos. Estas proteínas testiculares y las hormonas esteroidales influyen en la liberación de FSH, GNRH y LH en la hipófisis anterior a través del proceso de retroalimentación negativa (Giesecke *et al.* 2010c; Mishra *et al.* 2013). En un estudio realizado, se observó que en caballos de 1 a 5 años de edad, los niveles de FSH declinaron cerca de un año antes de la maduración sexual del testículo, lo cual sugiere que su función en el proceso de maduración espermática y mantenimiento de la espermatogénesis, es mínima (Giesecke *et al.* 2011). El gen que codifica para GNRH ha sido asociado con un aumento de la movilidad y del volumen espermático en toros (Sang *et al.* 2011; Yang *et al.* 2011).

La inhibina, la activina y la folistatina (FST) pertenecen a la familia del factor transformador de crecimiento  $\beta$  (TGF $\beta$ ) y actúan como marcadores del proceso de espermatogénesis (Toulis *et al.* 2010). La secreción de FSH es controlada por la inhibina, junto con los estrógenos y la testosterona (Bhardwaj *et al.* 2012). La FST producida en el testículo inhibe la secreción de FSH gracias a su unión con la activina (Giesecke *et al.* 2010c). En el equino, las concentraciones plasmáticas e intratesticulares de inhibina están asociadas con la maduración testicular y la fertilidad. La concentración intratesticular de inhibina es un marcador potencial para la detección temprana de problemas de fertilidad en los caballos jóvenes (Roser, 2008). Para medir dicha



concentración, es necesario coleccionar biopsias testiculares de los equinos (Giesecke *et al.* 2010b).

De esta manera, algunos genes que pueden ser considerados como potenciales candidatos para ser asociados con la fertilidad en equinos son aquellos que codifican para las inhibinas  $\alpha$  y  $\beta$  (INHA, INHBA, INHBB), así como para las activinas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  (ACTN, ACTB, ACTG). La inhibina es un heterodímero formado por una subunidad denominada inhibina $\beta$ A y una subunidad  $\alpha$ , que conducen a la inhibición de la secreción de FSH por parte de la hipófisis. La subunidad  $\beta$ A, participa además en la formación de activina A y activina AB, las cuales estimulan la secreción de FSH. Tanto la inhibina como la activina son producidas principalmente por las células de Sertoli del testículo y ambas participan en la activación de las células de Leydig para los procesos de esteroidogénesis y espermatogénesis (Giesecke *et al.* 2010b). En caballos Hannoverianos, se ha encontrado una correlación significativa de SNPs y sus haplotipos dentro del gen inhibina  $\beta$  A (INHBA) para la fertilidad. Las mutaciones en este gen generan un factor de transcripción alterado en varios sitios de unión, las cuales están asociadas a la regulación de la expresión de INHBA (Giesecke *et al.*, 2010c). En bovinos, se ha encontrado una asociación de la inhibina  $\alpha$  con la integridad del acrosoma, y de la inhibina  $\beta$  con el volumen del eyaculado y la movilidad espermática (Sang *et al.* 2011).

En los equinos, la prolactina producida por el gen receptor de prolactina PRLR, es secretada por la región distal de la adenohipófisis, en respuesta a la estimulación sexual (Thompson *et al.* 1996). Las concentraciones plasmáticas de prolactina se correlacionan positivamente con la duración del día y son más altas en caballos durante la época de monta (Roser, 2008). La prolactina (PRL) ejerce un efecto sobre la liberación de GnRH en el hipotálamo y de gonadotropinas en la hipófisis, teniendo gran influencia sobre la liberación de otras hormonas por parte del testículo (Henderson *et al.* 2008). La PRL participa en la regulación del proceso de sensibilidad a los andrógenos en los tejidos y junto con la hormona luteinizante (LH) y la hormona del crecimiento (GH), controla la síntesis de receptores hormonales luteinizantes en el testículo, la síntesis de andrógenos y estimula la espermatogénesis. Además es indispensable para el correcto funcionamiento de las glándulas accesorias y participa en el balance hidro-electrolítico en muchos mamíferos (Giesecke *et al.* 2010a). Giesecke *et al.* (2010a) encontraron una asociación significativa para dos polimorfismos (SNP) dentro del gen PRL con la tasa de concepción por estro en equinos de la raza Hannoveriano.

### **1.4.2 Marcadores genéticos asociados a la espermatogénesis.**

Durante el proceso de espermatogénesis, las espermátidas derivadas de las espermatogonias, se desarrollan dentro del testículo. Este proceso es seguido por la espermiogénesis, en el cual las espermátidas se convierten en espermatozoides. Ambos procesos son regulados, en su mayoría, por hormonas endocrinas. Sin embargo, se cree que la proteína asociada a la espermatogénesis 1 (SPATA1) está ampliamente implicada en este proceso, y aunque su función detallada aún se desconoce, es considerada como un gen candidato para fertilidad en machos murinos. La SPATA1 conduce a una expresión proteica que es estrictamente específica del testículo y se cree que posee gran influencia en la determinación de la forma de la cabeza de los espermatozoides durante el proceso de espermatogénesis (L'Hote *et al.* 2007). Diversos análisis de secuenciación de esta proteína, han revelado la conservación de un dominio específico de cromosomas, que está íntimamente ligado a procesos como la condensación cromosómica, la reparación y recombinación de ADN (Hirano 2002; Jessberger 2002). Giesecke *et al.* (2009) encontraron una asociación altamente significativa para el SNP intragénico de SPATA1 (BIEC2-968854) con rasgos de fertilidad en caballos Hannoverianos.

Por otro lado, la proteína de unión 6 a FK506, también conocida como FKBP6, parece tener una función importante en el proceso de espermatogénesis en humanos y roedores, específicamente en el apareamiento de los cromosomas homólogos durante la meiosis; esta proteína se expresa específicamente en el testículo (Sunnotel *et al.* 2010). Raudsepp *et al.* (2012) encontraron una asociación del gen FKBP6 con equinos que presentaban alteración en la ración acrosómica de los espermatozoides, sugiriéndose como candidato de subfertilidad y como un gen que interviene en la homeostasis del calcio, regulando la exocitosis del contenido acrosomal.

### **1.4.3 Marcadores genéticos asociados a la maduración espermática y al plasma seminal equino**

Las proteínas del plasma seminal derivadas del epidídimo y de las glándulas sexuales accesorias participan en la maduración espermática post-testicular, en la cual los espermatozoides adquieren su capacidad para fecundar (capacitación) (Sostaric *et al.* 2008). Algunas de estas proteínas se unen a la superficie del espermatozoide y actúan como punto de anclaje a estructuras en el tracto genital femenino. Otras proteínas

plasmáticas son necesarias en la modulación del sistema inmune de la hembra para suprimir la respuesta adversa que se genera contra las células espermáticas (Leeb *et al.* 2005).

En un estudio realizado con cinco equinos de la raza cuarto de milla y uno de la raza árabe, se encontró una asociación positiva ( $p < 0.05$ ,  $r^2 = 0.706$ ) entre la proteína HSP1 (72 kDa, PI: 5.6) y los equinos de alta fertilidad. La estimación de la fertilidad se realizó mediante la asignación de un puntaje de cubrición de servicios, calculando la tasa de concepción alcanzada en cuatro temporadas reproductivas sucesivas. Por el contrario, las proteínas HSP-2 (75 kDa, PI: 6.0), HSP-3 (18 kDa, PI: 4.3), y HSP-4 (16 kDa, PI: 6.5), se encontraron en mayor cantidad en caballos de baja fertilidad. (Brandon *et al.* 1999).

Hamann *et al.* (2007) analizaron la relación entre los genes CRISP (proteínas secretoras ricas en cisteína) y la fertilidad en equinos de la raza Hannoveriana. Basados en la secuencia de 26 exones para los tres genes equinos CRISP dentro de nueve razas diferentes, se identificaron 105 polimorfismos, entre los cuales se incluyen 30 polimorfismos para CRISP1, 23 nuevos polimorfismos para CRISP2 y 52 polimorfismos para CRISP3. Adicionalmente fueron caracterizados varios SNP no sinónimos en los 107 caballos Hannoverianos analizados en este estudio (Tabla 1-3).

**Tabla 1-3.** Polimorfismos para los genes CRISP en equinos de la raza Hanoveriana (Adaptado de Hamann *et al.* 2007)

<b>Polimorfismo</b>	<b>Aminoácido sustituido</b>	<b>Frecuencias alélicas</b>	<b>Frecuencias genotípicas</b>
<i>CRISP1</i> c.+110A>G	Glu37Gly	0.99 (A):0.01 (G)	0.98 (AA):0.02 (AG):0.00 (GG)
<i>CRISP2</i> c.+659A>G	Lys220Glu	0.87 (A):0.13 (G)	0.76 (AA):0.23 (AG):0.01 (GG)
<i>CRISP3</i> c.+199A>G	Lys67Glu	1.00 (A):0.00 (G)	1.00 (AA):0.00 (AG):0.00 (GG)
<i>CRISP3</i> c.+566C>A	Thr189Lys	0.58 (C):0.42 (A)	0.37 (CC):0.42 (AC):0.21 (AA)
<i>CRISP3</i> c.+622G>A	Glu208Lys	0.93 (G):0.07 (A)	0.87 (GG):0.11 (AG):0.02 (AA)
<i>CRISP3</i> c.+716A>G	Gln239Arg	0.54 (A):0.46 (G)	0.36 (AA):0.35 (AG):0.29 (GG)

En esta investigación, Hamann *et al.* (2007), encontraron una asociación significativa para el SNP CRISP3 AJ459965: c. 622 G> A con la fertilidad en los equinos estudiados. Dicho SNP conduce a la sustitución de los aminoácidos glutamina por lisina en la posición 208 de la proteína CRISP-3 (E208 K). Tal vez un cambio no conservativo del ácido glutámico a lisina en esta región de la proteína equina CRISP-3, podría alterar sus

propiedades de unión proteína-proteína, lo que podría afectar posteriormente la fertilidad del macho, teniéndose como hipótesis que el polimorfismo dentro del gen CRISP-3 puede afectar la función de la proteína en esta especie. Los caballos heterocigóticos para este polimorfismo c.+622GA, tuvieron una fertilidad menor cuando fueron comparados con los caballos homocigóticos c.+622GG. No se encontró diferencia estadística significativa entre los caballos heterocigóticos c.+622GA y los homocigóticos c.+622AA, probablemente debido al bajo número de observaciones de estos últimos en el grupo de estudio ( $n = 2$ ). Una posible explicación para la baja frecuencia del alelo c.+622A puede ser el resultado de la selección genética realizada para disminuir el bajo desempeño reproductivo en esta raza.

Resultados similares fueron hallados por Novak *et al.* (2010), quienes investigaron la asociación entre las proteínas espermáticas y del plasma seminal como posibles marcadores genéticos para la fertilidad en equinos, encontrando que una de las proteínas del plasma seminal equino que puede ser asociada positivamente con la fertilidad, es la CRISP-3. Por el contrario, reportaron la existencia de otras proteínas del plasma seminal como la proteína plasmática 1 Y 2 (HSP1 y HSP2), la clusterina y la proteína Kalikreina -1E2, que fueron asociadas negativamente con la fertilidad en esta especie.

Jobim *et al.* (2011), realizaron un estudio con equinos de la raza Hannoveriana y encontraron una diferencia estadística significativa para el contenido de diferentes proteínas entre caballos buenos y malos congeladores; observando niveles más altos de CRISP-3 (80–85 kDa, PI: 7.54) y HSP-2 (18.2 kDa, PI: 5.0 –5.2) en equinos buenos congeladores, mientras que en los malos congeladores se encontraron niveles mayores de lactoferrina (75.4 kDa, PI:6.9–7.4), kalikreína (26.7 kDa, PI: 5.51) y HSP-1 (13.9 kDa, PI 3.8-4.2). Estudios previos, han reportado que existe una proteína homóloga para la HSP-2 en la especie bovina denominada BSP A1/A2, la cual también ha sido correlacionada con toros cuyo semen es de alta congelabilidad (Jobim *et al.* 2004).

La proteína equina CRISP-3 fue caracterizada y secuenciada por primera vez por Magdaleno *et al.* (1997), sugiriéndose que podía tener un papel importante en la defensa espermática y en los procesos de fusión de membranas con el ovocito. Schambony *et al.* (1998) sugirió que la CRISP-3 es la principal proteína del plasma seminal equino, la cual puede encontrarse a concentraciones tan altas como 1 mg/ml en esta especie. Doty *et al.* (2011), encontraron que una de las funciones que presenta la proteína CRISP-3, es su acción moduladora a la unión de los polimorfonucleares, suprimiéndola de manera dosis dependiente con cantidades mayores a 125  $\mu$ l/ml ( $p < 0.05$ ). De esta manera ejerce

una función protectora para los espermatozoides contra la fagocitosis durante el transporte espermático en el oviducto de la hembra. Esto sugiere que cuando las hembras equinas son cubiertas por medio de la monta natural, podría encontrarse en el útero una concentración adecuada de CRISP-3, presentando un papel importante en los procesos de transporte y eliminación espermática.

Por otro lado, a pesar de que las proteínas HSP-1 y HSP-2 pertenecen a la misma familia, se cree que la HSP-1 presenta un grado diferente de glicosilación, influenciando el grado de anclaje a la heparina e influenciando otras propiedades de la proteína, lo cual genera las diferencias en su función y por tanto, entre equinos buenos y malos congeladores (Jobim *et al.* 2011). La lactoferrina por su parte, es una proteína de unión al hierro con una masa molecular de 80 kDa aproximadamente. Su papel fisiológico en el plasma seminal sigue sin estar claro, sin embargo se conoce que es secretada por el epidídimo en la especie equina (Fouchecourt *et al.* 2000). La transferrina que sirve como una de las principales proteínas de unión a hierro en el suero, también está presente en el plasma seminal, siendo producida por las células de Sertoli. Ambas proteínas son homólogas. Se ha reportado un aumento de la concentración de lactoferrina en muestras de semen de pacientes humanos que muestran oligospermia y oligoastenospermia, en comparación con muestras en normospermicos (Buckett *et al.* 1997). Adicionalmente, en los seres humanos y en la especie bovina, los niveles anormales de transferrina en el plasma seminal se han asociado con disfunción testicular y reducción de la fertilidad (Jobim *et al.* 2011).

La kalikreína, una proteína perteneciente a la familia de las proteasas de serina, fue descubierta inicialmente en el semen y fue la proteína sérica más usada como marcador para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata. Esta proteína, ha sido aislada y purificada del plasma seminal equino, presentando una gran homología con la secuencia del antígeno específico prostático (PSA) en los seres humanos (Olsson *et al.* 2004; Lundwall y Brattsand, 2008)

Otro gen candidato que participa en la maduración espermática en los equinos es el gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que codifica para una isoenzima somática hallada en la sangre y diversos tejidos, incluyendo el epidídimo, y una isoenzima específica localizada en los testículos que interviene en el desarrollo de espermátidas y de espermatozoides maduros. Diversos estudios, han reportado que la actividad de la ECA en la membrana plasmática de los espermatozoides equinos es significativamente mayor que en el plasma seminal y que existe una actividad

significativamente mayor en el testículo pospuberal en esta especie en comparación con el testículo prepuberal (Ball *et al.* 2003; Giesecke *et al.* 2010c).

La osteopontina es una glicoproteína ácida del plasma seminal que se liga a los espermatozoides después de la eyaculación (Souza *et al.* 2008). En equinos se ha reportado una concentración mayor de esta proteína en el plasma seminal de caballos de alta fertilidad, comparada con los de baja fertilidad (Brandon *et al.* 1999; Waheed *et al.* 2013); resultados similares se han encontrado para la especie bovina (Cancel *et al.* 1997; Moura *et al.* 2006). Diversos mecanismos se han descrito para la relación de esta proteína con la fertilidad: ligarse a receptores de integrina localizados en la superficie del epitelio celular, pudiendo presentar una función protectora en infecciones bacterianas (Cancel *et al.* 1999); participar en la ligación a las integrinas del ovocito durante el proceso de fertilización; inducir la capacitación del espermatozoide, aumentar su viabilidad mediante el bloqueo de vías apoptóticas y prevenir la poliespermia (Erikson *et al.* 2007); así como aumentar la capacidad de penetración del espermatozoide al ovocito (Moura *et al.* 2007)

#### **1.4.4 Marcadores genéticos asociados al proceso de fertilización**

La zonadhesina (ZAN) es una proteína de la membrana del espermatozoide que se une a la zona pelúcida del ovocito en varias especies mamíferas (Tardif *et al.* 2010). En los equinos, la ZAN está localizada en el área donde se formará el futuro contenido acrosomal en las espermátidas redondas y en el espacio luminal de las espermátides alargadas y de los espermatozoides. Se han encontrado diferencias en este polipéptido de entre sementales fértiles y subfértiles, pudiéndose considerar como un marcador de fertilidad (Bailey *et al.* 2006).

La proteína de superficie espermática  $\beta$  fertilina (ADAM2), perteneciente a la familia de genes ADAM, interviene en el proceso de adhesión de los espermatozoides a la membrana del ovocito, pudiéndose considerar como un importante gen candidato de fertilidad (Primakoff y Myles, 2000). La fertilización del ovocito se caracteriza por un incremento en la concentración intracelular de Calcio, la cual genera la activación celular. En estudios realizados se demuestra la existencia de un factor espermático que induce este incremento oscilatorio de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ovocito, estos hallazgos soportan la hipótesis de que después de la fusión de los gametos, los espermatozoides introducen

dicho factor espermático a la célula femenina, para iniciar las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y el desarrollo embrionario (Gradil *et al.* 2006; Swann y Lai, 2013). Estudios sugieren que el componente activo de este factor espermático es la fosfolipasa C $\zeta$  específica en el espermatozoide (PLCz), la cual es la responsable del desarrollo del ovocito en varios mamíferos (Swann *et al.* 2006). Además se cree que inicia el aumento de la producción de inositol trifosfato en los ovocitos, causando oscilaciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Investigaciones demuestran que la concentración de PLCz se ve reducida en caballos infértiles, lo que sugiere que la expresión de este gen podría utilizarse como indicador para la infertilidad (Gradil *et al.* 2006). Adicionalmente la variación genética en la región promotora del gen PLCz, ha sido asociada con características de calidad seminal en bovinos (Pan *et al.* 2013). Schrimpf *et al.* (2014) reportaron 47 polimorfismos dentro del gen PLCz en caballos de la raza Hanoveriana; tres de estos SNPs fueron asociados con la tasa de preñez por ciclo estral, sugiriendo este gen como un marcador de fertilidad en la especie equina.

Por otro lado, se cree que la proteína espermática autoantogénica (SP17) participa en la unión del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito en el equino. Estudios recientes han demostrado que la SP17 no es específica del testículo como se creía anteriormente y que es una proteína compuesta por tres dominios funcionales, responsables de la unión de la heparina y la calmodulina y que juega un papel importante en la migración, la adhesión celular y la fertilización (Giesecke *et al.* 2011).

## 1.5 Bibliografía

1. Abdulkareema T.A., Al-Habobyb A.H., Al-Mjameia S.M., Hobia A.A. Sperm abnormalities associated with vitamin A deficiency in rams. *Small Ruminant Res* 2005 57: 67–71
2. Agüero A., Miragaya M.H., Mora N.G., Chaves M.G., Neild D.M., Beconi M.T. Effect of vitamin E addition on equine sperm preservation. *Comunicaciones Biologicas* 1995; 13: 343-56.
3. AHC, American Horse Council. The economic impact of the horse industry on the United States national report. Ed. Deloitte. USA, 2005.

4. Aitken R.J., Curry B.J. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants and Redox Signaling* 2011; 14 (3): 367–381.
5. Aitken R.J., Gibb Z., Mitchell L.A., Lambourne S.R., Connaughton H.S., De Iuliis G.N. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biology of Reproduction* 2012; 87 (5): 110
6. Akhoondi M., Oldenhof H., Sieme H., Wolkers W.F. Freezing-induced cellular and membrane dehydration in the presence of permeable protectants. *Molecular Membrane Biology*. 2012; 29:197–206.
7. Akinloye O., Abbiyesuku F.M., Oguntibeju O.O., Arowojolu A.O., Truter E.J. The impact of blood and seminal plasma zinc and copper concentrations on spermogram and hormonal changes in infertile Nigerian men. *Reprod Biol*. 2011; 11: 83–98.
8. Álamo D., Batista M., González F., Rodríguez N., Cruz G., Cabrera F., et al. Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152°C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*. 2005; 63(1):72-82.
9. Albarracín M. Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica open pulled straw: estudio estructural de cromosomas microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro [tesis de doctorado]. España: Facultad de veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona; 2005.
10. Alghamdi A.S., Troedsson M.H., Xue J.L., Crabo B.G. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on post-thaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *American Journal of Veterinary Research* 2002; 63: 880-5.
11. Alkmin D.V., Perez-Patiño C., Barranco I., Parrilla I., Vazquez J.M., Martinez E.A., Rodriguez-Martinez H., Roca J. Boar sperm cryosurvival is better after



- exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. *Cryobiology* 2014; 69: 203–210
12. Almeida J.L. and Ball B. Effect of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2005; 87(3-4): 321-337.
  13. Alvarez J.G., Touchstone J.C., Blasco L., Storey B.T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology*. 1987; 8: 338–348.
  14. Asadpour R. The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2012; 40(2): 1027
  15. Asari M., Sasaki K., Miura K., Ichihara N. and Nishita T. Immunohistolocalization of the carbonic anhydrase isoenzymes (CA-I, CA-II and CA-III) in the reproductive tract of male horses. *American Journal of Veterinary Research* 1996; 57: 439-443
  16. Assumpção T.I., Torres R.A.A. Jr, Sousa M.V., Ricart C.A.O. Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore Bulls. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2005; 57: 55–61.
  17. Aurich J.E., Kuhne A., Hoppe H., Aurich C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*. 1996; 46: 791–797.
  18. Aurich J.E., Schonherr U., Hoppe H., Aurich C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*. 1997; 48(2):185-192
  19. Baldauf C., Miska W., Weidner W., Schill W.B., Henkel R. Principal cells in the cauda epididymidis resorb zinc eliminated from spermatozoa. *Andrologia* 2003; 35:3.

20. Bailey J., Bilodeau J., Cormier N. Semen cryopreservation in minireview domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*. 2000; 21(1):1-7.
21. Bailey L.B., Brady H.B., Tardif S., Thompson L.D., Hardy D.M. Zonadhesin expression and localisation in stallion testes. *Animal Reproduction Science* 2006; 94: 56–59.
22. Baker M.A., Hetherington L., Ecroyd H., Roman S.D. and Aitken R.J. Analysis of the mechanisms by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *Journal of Cell Science* 2004; 117, 211-222
23. Balercia G., Mosca F., Mantero F., Boscaro M., Mancini A., Ricciardo-Lamonica G., Littarru G. Coenzyme Q (10) supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. *Fertility and Sterility*. 2004; 81: 93-98.
24. Ball B. A., Gravance C. G., Medina V., Baumber J. and Liu I. K. M. Catalase activity in equine sêmen. *American Journal of Veterinary Research*. 2000; 61: 1026-1030
25. Ball B. A., Vo A. T. and Baumber J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research*. 2001a; 62: 508-515
26. Ball B.A., Medina V., Gravance C.G., Baumber J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*. 2001b; 56 (4): 577-589.
27. Ball B.A., Gravance C.G., Wessel M.T. Sabeur K. Activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of angiotensin II on sperm motility. *Theriogenology* 2003; 59: 901-914
28. Ball B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*. 2008; 107 (3-4): 257–267.

29. Bansal A.K., Bilaspuri G.S. Effect of manganese on bovine sperm motility, viability, and lipid peroxidation in vitro. *Animal Reproduction CBRA* 2008; 5 (3-4): 90–96.
30. Barranco I., Tvarijonaviciute A., Perez-Patiño C., Parrilla I., Ceron J.J., Martinez E.A., et al. High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. *Scientific Reports* 2015; 21 (5): 18538
31. Bansal A.K., Bilaspuri G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International* 2011; article ID 686137: 7 p.
32. Barrier-Battut I., Delajarrad H., Legrand E., Bruyas J.F., Fiéni F., Tainturier D., et al. Calcium, magnesium, copper and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. *Theriogenology*. 2002; 58: 229-32.
33. Barrios B., Pérez-Pé R., Gallego M., Tato A., Osada J., Muiño-Blanco T. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction* 2000; 63:1531–1537.
34. Barros A.I.R.N.A., Nunes F.M., Gonçalves B., Bennett R.N., Silva A.P. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry* 2011; 128: 165-172.
35. Baumber J., Ball B., Gravance C., Medina V., Davies-Morel M. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology* 2000; 21(6): 895-902.
36. Baumber J., Vo A., Sabeur K. and Ball B. A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 2002; 57: 1025-1033.
37. Baumber J., Sabeur K., Vo A. and Ball B. A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 2003; 60: 1239-1247

38. Baumber J., Ball B.A., Linfor J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Animal Journal of Veterinary Research*. 2005; 66(5):772-779.
39. Beconi M.T., Francia C.R., Mora N.G., Affranchino M.A. Effect of natural antioxidants in frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 1993; 40(4): 841-51.
40. Benov L., Beema A.F. Superoxide-dependence of the short chain sugars-induced mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine* 2003; 34: 429-433.
41. Bentinger M., Brismar K., Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*. 2007; 7 Suppl: S41–S50.
42. Bhardwaj A., Nayan V., Parvati M., Gupta A.K. Inhibin: A role for fecundity augmentation in farm animals. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 2012; 7: 771-789.
43. Björndahl L., Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Molecular Human Reproduction* 2010; 16: 23–9
44. Brandon C.I., Heusnes G.L., Caudle A.B., Fayrer-Hosken R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*. 1999; 52: 863 – 873
45. Breier B.H., Vickers M.H., Gravance C.G., Casey P.J. Growth hormone (GH) therapy markedly increases the motility of spermatozoa and the concentration of insulin-like growth factor-I in seminal vesicle fluid in the male GH-deficient dwarf rat. *Endocrinology* 1996; 137:4061– 4064.
46. Brum A., Sabeur K., Ball B. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology* 2008; 69(9): 1041-1055
47. Buckett W.M., Luckas M.J., Gazvani M.R., Aird I.A., Lewis-Jones DI. Seminal plasma lactoferrin concentrations in normal and abnormal semen samples. *J Androl* 1997; 18: 302– 4.

48. Buonaguidi A., Mondina R., Polvani F. Prospectives of the study of seminal fluid in the diagnosis of infertility. *Minerva Ginecologica* 1991; 43: 499-503.
49. Burnaugh L.; Sabeur K. and Ball, B. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology*. 2007; 67 (3): 580–589.
50. Burnaugh L., Ball B.A., Sabeur K., Thomas A.D., Meyers S.A. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Animal Reproduction Science*. 2010; 117 (3-4): 249–260
51. Calisici O., Busche R., Bollwein H. Determination of total antioxidant capacity in Bull seminal plasma. *Reproduction in Domestic Animals* 2008; 43: Suppl. 1, 1-40
52. Callewaert L., Christiaens V., Haelens A., Verrijdt G., Verhoeven G., Claessens F. Implications of polyglutamine tract in the function of the human androgen receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 306: 46–52.
53. Calvin H.I., Cooper G.W., Wallace E.W. Evidence that selenium in rat sperm is associated with a cysteine-rich structural proteins of the mitochondrial capsule. *Games Research*. 1981; 4: 139–145.
54. Cancel A.M., Chapman D.A., Killian G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction* 1997; 57: 1293-1301
55. Cancel A.M., Chapman D.A., Killian G.J. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biology of Reproduction* 1999; 60: 454-460
56. Cardozo J.A., Fernández-Juan M., Forcada F., Abecia A., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J.A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*. 2006; 66: 841–850.

57. Carocho M., Ferreira I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 51: 15-25.
58. Carver D.A. and Ball B.A. Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology* 2002; 58: 1587-1595
59. Cederroth C.R., Pitetti J.-L., Papaioannou M.D., Nef S. Genetic programs that regulate testicular and ovarian development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2007; 265–266: 3–9.
60. Cevik M., Tuncer P.B., Tasdemir U., Ozgurtas T. Comparison of spermatological characteristics and biochemical seminal plasma parameters of normozoospermic and oligoasthenozoospermic bulls of two breeds. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2007; 31: 381–387.
61. Chenier T., Merckies K., Leibo S., Plante C., Johnson W. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. *AAEP Proceedings* 1998; 44: 5-6.
62. Chi H., Kim J., Ryu C., Lee J., Park J., Chung D., et al. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 2008; 23(5): 1023-1028.
63. Chow P., White I., Pickett B. Stallion sperm and seminal plasma phospholipids and glycerylphosphorylcholine. *Animal Reproduction Science* 1986; 11: 207-213.
64. Cohen D.J., Maldera J.A., Muñoz M.W., Ernesto J.I., Vasen G., Cuasnicu P.S. Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISP) and their role in mammalian fertilization. *Biological Research* 2011; 44: 135-138
65. Colenbrander B., Fazeli A.R., Van Buiten A., Parlevliet J., Gadella B.M. Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum*. 1992; 88: 49–58

66. Colleoni S., Lagutina I., Lazzari G., Rodríguez-Martínez H., Galli C., Morrel J.M. New methods for selecting stallion spermatozoa for assisted reproduction. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2011; 31: 536-541.
67. Connor M.C. Development of an ELISA to measure CRISP-3 concentration in equine seminal plasma. Thesis presented for the degree of Master of Science. University of Florida, 2009.
68. Contri A., Amicis I.D., Molinari A., Faustini M., Gramenzi A., Robbe D., Carluccio A. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology* 2011; 75(7): 1319-26.
69. Corrales J.J., Burgo R.M., Galindo P., Muñoz-Barroso I., Miralles J.M., Villar E.V. Abnormal expression of acid glycosidases in seminal plasma and spermatozoa from infertile men with varicocele. *Reproduction* 2002; 123: 411-417
70. Dacheux J., Gatti J.L., Dacheux F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy Research and Technique*. 2003; 61: 7–17.
71. De Oliveira R.A., Wolf C.A., De Oliveira M.A.V., Gambarini M.L. Addition of Glutathione to an Extender for Frozen Equine Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* 2013; 33:1148–1152
72. Devireddy R., Swanlund D.J, Olin T., Vincente W., Troedsson M.H., Bischof J.C. et al. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biology Reproduction*. 2002; 66 (1): 222–231.
73. Diafouka F., Gbassi G.K. Deficiency of alpha-tocopherol in seminal fluid as a probable factor in low fertility in Cote d'Ivoire. *African Journal of Reproductive Health* 2009; 13: 123–125.
74. Dias A.J., Maia M.S., Retamal C.A. Lopez M.L. Identification and partial characterization of a-1,4-glycosidase activity in equine epididymal fluid. *Theriogenology* 2004; 61: 1545-1558

75. Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine* 2002; 32: 1102-1115.
76. Domínguez M.P., Falcinelli A., Hozbor F., Sánchez E., Cesari A., Alberio R.H. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*.2008; 69: 564–573.
77. Doty A., Buhi W.C, Benson S., Scoggin K.E, Pozor M., Macpherson M., Mutz M. and Troedsson M.H.T. Equine CRISP3 Modulates Interaction Between Spermatozoa and Polymorphonuclear Neutrophils. *Biology of Reproduction*. 2011; 85: 157 – 164.
78. Eghbali M., Alvi-Shoushtari S.M., Rezaii S.A. Effects of copper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2008; 11: 1964–1968.
79. El-Hajj Ghaoui R., Thomson P.C., Evans G., Maxwell W.M.C. Characterization and localization of membrane vesicles in ejaculate fractions from the ram, boar and stallion. *Reproduction in Domestic Animals*.2004; 39: 173–180.
80. Erikson D.W., Way A.L., Chapman D.A., Killian G.J. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. *Reproduction* 2007; 133: 909-917
81. Eroglu M., Sahin S., Durukan B., Ozakpinar O.B., Erdinc N., Turkgeldi L., et al. Blood serum and seminal plasma selenium, total antioxidant capacity and coenzyme q10 levels in relation to semen parameters in men with idiopathic infertility. *Biological Trace Element Research* 2014; 159: 46–51
82. Fagundes B. Análise do congelamento e descongelamento de sêmen eqüino utilizando proteínas do plasma seminal em diferentes concentrações. *Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2003. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2003. 47p.*



83. FAO. Plan nacional de acción para la conservación, mejoramiento y utilización sostenible de los recursos genéticos animales de Colombia. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, Bogotá, 2010.
84. FAO. The statistics division of the FAO [citado 07 de Diciembre de 2014]. Disponible en: URL: <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor>
85. Fariss M.W., Nicholls-Grzemeski F.A., Tirmenstein M.A., Zhang J.G. Enhanced antioxidant and cytoprotective abilities of vitamin E succinate is associated with a rapid uptake advantage in rat hepatocytes and mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 31: 530–541.
86. Fazeli F., Salimi S. Correlation of seminal plasma total antioxidant capacity and malondialdehyde levels with sperm parameters in men with idiopathic infertility. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry* 2016; Inpress (Inpress): e29736
87. Ferrusola C.O., Fernandez L.G., Sandoval C.S., Garcia, B.M., Martinez, H.R., Tapia, J.A. et al. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces “apoptosis like” changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2010; 74 (3): 458–465
88. Fingerova H., Novotny J., Barborik J., Brezinova J., Svobodova M., Krskova M., Oborna I. Antioxidant capacity of seminal plasma measured by Tas Randox®. *Biomedical Paper of Medical Faculty of the University of Palacky Olomouc Czech Republic*. 2007; 151(1):37-40.
89. Foote R.H., Brockett C.C., Kaproth M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science* 2002; 71(1): 13-23.
90. Fouchecourt S., Metayer S., Locatelli A., Dacheux F., Dacheux J. Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. *Biology of Reproduction* 2000; 62: 1790 –1803.
91. Gambhir K.K., Ahluwalia B.S. Vitamin A in bovine sperm acrosomes. *Journal of reproduction and fertility* 1975; 43: 129–32

92. García B.M., Fernández L.G., Ferrusola C.O., Salazar-Sandoval C., Rodríguez A.M., Martínez H.R., et al. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011; 46(1): 141-148.
93. Ghiselli A., Serafini M.; Natella F., Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000; 29(11):1106-1114.
94. Gibb Z., Lambourne S.R., Aitken R.J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biology of Reproduction* 2014; 91(3): 77.
95. Gibb Z., Aitken R.J. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. *BioMed Research International*. 2016; Article ID 9380609, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9380609>
96. Giesecke K., Hamann H., Stock K.F., Woehlke A., Sieme H., Distl O. Evaluation of SPATA1-associated markers for stallion fertility. *Animal Genetics*. 2009;40: 359 – 365
97. Giesecke K., Hamann H., Sieme H., Distl O. Evaluation of Prolactin Receptor (PRLR) as Candidate Gene for Male Fertility in Hanoverian Warmblood Horses. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010a; 45: 124 – 130
98. Giesecke K., Hamann H, Sieme H., Distl O. INHBA-Associated Markers as Candidates for Stallion Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010b; 45: 342 – 347.
99. Giesecke K., Sieme H., Distl O. Infertility and candidate gene markers for fertility in stallions: A review. *The Veterinary Journal*. 2010c; 185: 265 – 271
100. Giesecke K., Hamann H., Stock K.F, Klewitz J., Martinsson G., Distl O., Sieme H. Evaluation of ACE, SP17, and FSHB as candidates for stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Animal Reproduction Science*. 2011; 126: 200 – 206.

101. Gonçalves F., Barretto L.S.S., Arruda R.P., Perri S.H.V., Mingoti G.Z. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reproduction in Domestic Animals* 2010; 45: 129–135.
102. Gradil C., Yoon S.Y., Brownb J., Hea C., Visconti P., Fissore R. PLC $\zeta$ : A marker of fertility for stallions? *Animal Reproduction Science*. 2006; 94: 23 – 25.
103. Guasti P.N, Monteiro G.A, Papa F.O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. *Veterinária e Zootecnia*. 2012; 19(2): 169-180
104. Guasti P.N., Souza F.F., Scott C., Hartwig F.P., Papa M.P., Dos Santos G.A.M., et al. Protein content of equine seminal plasma and sperm plasma membrane in subfertile stallions. *Journal of Equine Veterinary Science* 2014; 34: 84-85
105. Gürler H., Calisici O., Bollwein H. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 2015; 155: 99-105.
106. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 2007, 35: 1147-1150.
107. Hamann H., Jude R., Sieme H., Mertens U., Topfer-Petersen E., Distl O. et al. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Animal Genetics*. 2007; 38: 259 – 264.
108. Hatamoto L.K., Batista Sobrinho C.A., Nichi M, Barnabe V.H., Barnabe R.C., Cortada C.N.M. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology* 2006; 66(6-7): 1610-44.
109. Hejmej A., Wiszniewska B., Kosiniak-Kamysz K., Sadowska J., Bilinska B. The presence of androgen receptors in the epididymidis and prostate of the

- stallion and cryptorchid horse – a preliminary study. *The Veterinary Journal* 2006; 171: 373–379.
110. Henderson H.L., Hodson D.J., Gregory S.J., Townsend J., Tortonese D.J. Gonadotropin-releasing hormone stimulates prolactin release from lactotrophs in photoperiodic species through a gonadotropin-independent mechanism. *Biology of Reproduction* 2008; 78: 370–377
111. Henricks D.M., Kouba A.J., Lackey B.R., Boone W.R., Gray S.L. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biology of Reproduction*. 1998; 59:330–337.
112. Hess R.A., Zhou Q., Nie R., Oliveira C., Cho H., Nakaia M., Carnes K. Estrogens and epididymal function. *Reproduction, Fertility and Development*. 2001; 13: 273–283.
113. Hess R.A. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003; 1: 52.
114. Hidalgo C., Diez C., Duque P., Prendes J.M., Rodriguez A., Goyache F., et al. Oocytes recovered from cows treated with retinol become unviable as blastocysts produced in vitro. *Reproduction* 2005; 129: 411–21.
115. Hirano T. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes and Development* 2002; 16: 399–414.
116. Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K, Sieme H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Animal Reproduction Science*. 2011; 125(1-4): 112-118
117. Hogarth C.A., Griswold M.D. The key role of vitamin A in spermatogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 2010; 120: 956–62.

118. Hoogewijs M., Morrell J., Van Soom A., Govaere J., Johannisson A., Piepers S., DeSchauwer C., et al. Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. *Equine Veterinary Journal*. 2011; 43(Suppl 40): 35-41
119. Hurtado de Catalfo G.E., Ranieri-Casilla A., Marra F.A., Alaniz M.J., Marra C.A. Oxidative stress biomarkers and hormonal profile in human patients undergoing varicocelelectomy. *International Journal of Andrology* 2007; 30: 519–530.
120. Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I.I., Montag, M., Dessole, S., Nawroth, F., et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biology of Reproduction*. 2004; 71 (4): 1167–1173.
121. Isachenko V., Maettner R., Petrunkina A.M., Mallmann P., Rahimi G., Sterzik K., Sanchez R., Risopatron J., Damjanoski I., Isachenko E. Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in large (up to 0.5 mL) volume: a novel technology. *Clinical Laboratory*. 2011; 57(9-10):643-50.
122. Jessberger R. The many function of SMC proteins in chromo-some dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002; 3: 767–78
123. Jobim M.I.M., Oberst E.R., Salbego C.G., Souza D.O., Wald V.B., Tramontina F., Mattos R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*. 2004; 61: 255–266.
124. Jobim M.I.M, Treina C., Zirklerb H., Gregorya R.M., Siemec H., Mattos R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*. 2011; 76: 765–771
125. Johannisson A., Morrell J.M., Thorén J., Jönsson M., Dalin A.M., Rodríguez-Martínez H. Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science*. 2009; 116: 119-128.

126. Juyena N.S. Protein Profiles and Biochemical Characteristics of Semen: Influence on Frozen-Thawed Spermatozoal Quality in Rams (*Ovis aries*) and Alpacas (*Vicugna pacos*) [PhD thesis]. Padua, Italy:University of Padua; 2011.
127. Juyena N.S., Stelletta C. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2012; 33(4): 536 – 551. *Andrologia* 2014; 46: 472–478
128. Kadirve G., Kumar S., Ghosh S.K., Perumal P. Activity of antioxidative enzymes in fresh and frozen thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to lipid peroxidation and semen quality. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 2014; 3(3): 210-217
129. Kancheva V.D. Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chain-breaking activity: A comparative study. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2009; 111: 1072-1089.
130. Kandár R., Drábková P., Myslíková K., Hampl R. Determination of retinol and a-tocopherol in human seminal plasma using an HPLC with UV detection. *Andrologia*. 2014; 46(5): 472-478.
131. Kankofer M., Kolm G., Aurich J., Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology* 2005; 63(5): 1354-1365.
132. Kao S.H., Chao H.T., Chen H.W., Hwang T.I., Liao T.L., Wei Y.H. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and Sterility* 2008; 89: 1183–1190.
133. Kareskoski A.M., Reilas T., Sankari S., Andersson M. Katila T. Composition of fractionated stallion ejaculates. *Animal Reproduction Science* 2005; 89: 228
134. Kareskoski M., Katila T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science*. 2008; 10 (7): 249-56.

135. Katila T., Anderson M., Reilas T., Koskinen E. Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. *Theriogenology* 2002; 58:241-244.
136. Katila T., Kareskoski M. Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. *Pferdeheilkund.* 2006; 22 (2): 193 - 200.
137. Khosravi F., Valojerdi M.R., Amanlou M., Karimian L., Abolhassani F. Relationship of seminal reactive nitrogen and oxygen species and total antioxidant capacity with sperm DNA fragmentation in infertile couples with normal and abnormal sperm parameters. *Andrologia.* 2014; 46: 17–23
138. Kim J.G., Parthasarathy S. Oxidation and the spermatozoa. *Seminars in Reproductive Endocrinology.* 1998; 16 (4): 235–239
139. Kirschvink N, De Moffarts B., Lekeux P. The oxidant/antioxidante equilibrium in horses. *Vet J.* 2008; 177(2): 178-191.
140. Krausz C., Giachini C. Genetic risk factors in male infertility. *Archives of Andrology: Journal of Reproductive Systems* 2007; 53: 125–133.
141. Lahnsteiner F., Mansour N., Plaetzer K. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. *Animal Reproduction Science* 2010; 119: 314–321
142. Lapointe S., Ahmad I., Buhr M. M. and Sirard M.-A. Modulation of postthaw motility, survival, calcium uptake, and fertility of bovine sperm by magnesium and manganese. *Journal of Dairy Science.* 1996; 79: 2163-2169
143. Leeb T., Sieme H., Töpfer-Petersen, E. Genetic markers for stallion fertility - lessons from humans and mice. *Animal Reproduction Science.* 2005; 89: 21 -29.
144. Lenzi A., Picardo M., Gandini L., Dondero F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update* 1996; 2: 246–256.

145. Leonhard-Marek S. Influence of drugs, pollution and trace elements on male fertility. In: Busch W, Holzmann A, editors. *Andrology in veterinary medicine*. Schattauer: Stuttgart; 2001: 474–81.
146. L'Hote D., Serres C., Laissue P., Oulmouden A., Rogel-Gaillard C., Montagutelli X., Vaiman D. Centimorgan-range one-step mapping of fertility traits using interspecific recombinantcongenic mice. *Genetics* 2007; 176: 1907–21.
147. Li-hong Q., Ying R., Chang L., Jin-yu Z., Jia-bao Z., Zhi-hui Z. SNP Analysis of 5'UTR of androgen receptor gene and its relationship with semen quality in bulls. *Journal of Jilin Agricultural University* 2010; 32 (3): 335-339.
148. Linster C.L., Van-Schaftingen E. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *The FEBS Journal* 2007; 274(1): 1-22.
149. Liu Z., Foote R., Brockett C. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology* 1998; 37(3):219-230.
150. Lobo V., Phatak A., Chandra N. Free radicals and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 2010; 4: 118-126.
151. Loomis P.R. The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science*. 2001; 68: 191–200
152. Loomis P.R. and Graham J.K. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*. 2008; 105: 119–128
153. Lopera V., Méndez I., Peña M., Góngora A. Vitrificación de oocitos bovinos inmaduros por el método de la pajilla abierta y estirada (Open pulled Straw - OPS). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2007; 20: 532-540.
154. Lozino B. D., Gil H.L., Álvarez S.M.C. Efecto de la adición de plasma seminal en el semen equino descongelado. *Revista Sanidad Militar*. 2011; 67 (3): 284 – 290.



155. Lü J., Lin P.H., Yao Q., Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2010; 14: 840-860.
156. Lundwall A., Brattsand M. Kallikrein-related peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2008; 65: 2019 –38.
157. Macpherson M.L, Simmen R.C.M, Simmen F.A, Hernandez J., Sheerin B.R, Varner D.D, Loomis P., Cadario M.E, Miller C.D, Brinsko S.P, Rigby S. Blanchard T.L. Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 and -5 in Equine Seminal Plasma: Association with Sperm Characteristics and Fertility. *Biology of Reproduction*. 2002; 67: 648–654
158. Maestro R.D., Borja R.P. Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Licencia Creative Commons 3.0 España. 1993; 44(2): 107-111.
159. Magdaleno L., Gasset M., Varea J., Schambony A.M., Urbanke C., Raida M., Topfer-Petersen E., Calvete J.J. Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *FEBS Letters* 1997; 420:179–185.
160. Mahfouz R., Sharma R., Sharma D., Sabanegh E., Agarwal A. Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertility and Sterility*. 2009; 91(3): 805-811
161. Mantovani R., Rota A., Falomo M., Bailoni L., Vincenti L. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reproduction Nutrition Development*. 2002; 42(3): 217-226.
162. Marengo S.R. Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Animal Reproduction Science*. 2008; 10 (5): 52-63.

163. Marquez B. and Suarez S.S. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of Reproduction* 2004; 70: 1626-1633
164. Martí E., Martí J.I., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J.A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2008; 29: 459–467
165. Martínez-Soto J., Landeras J., Gadea J. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology* 2013; 1: 365-375.
166. Marzec-Wróblewska U., Kamiński P., Lakota P., Szymański M., Wasilow K., Ludwikowski G., et al. Zinc and iron concentration and SOD activity in human semen and seminal plasma. *Biological Trace Element Research* 2011; 143(1): 167-77.
167. Massanyi P., Trandzik J., Nad P., Toman R., Skalicka M., Korenekova B. Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. *Asian Journal of Andrology* 2003; 5: 101–104.
168. Matsuoka T., Imai H., Asakuma S., Kohno H., Fukui Y. Changes of fructose concentrations in seminal plasma and glucose and testosterone concentrations in blood plasma in rams over the course of a year. *Journal of Reproduction and Development* 2006; 52: 805–810
169. Maxwell W.M.C, Evans G., Mortimer S.T., Gillan L., Gellatly E.S., McPhie C.A. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen–thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction Fertility and Development* 1999; 11: 123–126.
170. Maxwell W.M.C., De Graaf S.P., Ghaoui R.E.H., Evans G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society for Reproduction and Fertility* 2007; 64: 13–38.

171. Maya-Soriano M.J., Taberner E., Sabés-Alsina M., López-Béjar M. Retinol might stabilize sperm acrosomal membrane in situations of oxidative stress because of high temperatures. *Theriogenology*. 2013; 79: 367–373
172. Medeiros A., Gomes G., Carmo M., Papa F., Alvarenga M. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*. 2002; 58(2):273-276.
173. Mehrotra A., Katiyar D.K., Agarwal A., Das V., Pant K.K. Role of total antioxidant capacity and lipid peroxidation in fertile and infertile men. *Biological Research* 2013; 24 (3): 347-352.
174. Membrillo A., Córdova A., Hicks J., Olivares-Corichi I., Martínez V, Valencia J. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *INCI* 2003; 28(12):699:704.
175. Miah A.G., Salma U., Sinha P.B., Hölker M., Tesfaye D., Cinar M.U., Tsujii H., Schellander K. Intracellular signaling cascades induced by relaxin in the stimulation of capacitation and acrosome reaction in fresh and frozen-thawed bovine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2011; 125(1-4): 30-41.
176. Michael A.J., Alexopoulos C., Pontiki E.A., Hadjipavlou-Litina D.J., Saratsis P.H., Ververidis H.N., Boscos C.M. Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation. *Theriogenology* 2008; 70:827-835.
177. Michailov Y., Ickowicz D., Breitbart H. Zn<sup>2+</sup> -stimulation of sperm capacitation and of the acrosome reaction is mediated by EGFR activation. *Developmental Biology* 2014; 396: 246–55
178. Mishra C., Palai T.K., Sarangi L.N., Prusty B.R., Maharana B.R. Candidate gene markers for sperm quality and fertility in bulls. *Veterinary World* 2013; 6: 906-910.
179. Moore A.I., Squires E.L., Graham J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*. 2005a; 51, 241–249.

180. Moore A.I., Squires E.L., Graham J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 2005b; 63: 2372–2381
181. Moretti E., Castellini C., Mourvaki E., Capitani S., Geminiani M., Renieri T., Collodel G. Distribution of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tocopherols in seminal plasma and sperm fractions of men with normal and abnormal semen parameters. *Journal of Andrology* 2011; 32: 232–239.
182. Morris G.J., Faszler K., Green J.E., Draper D., Grout B.W.W, Fonseca F. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology*. 2007; 68(5): 804–812
183. Morte M.I., Rodrigues A.M., Soares D., Rodrigues A.S., Gamboa S., Ramalho-Santos J. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: Seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. *Animal Reproduction Science*. 2008; 106 (1-2): 36–47.
184. Mortimer S.T., Maxwell W.M.C. Effect of medium on the kinematics of frozen–thawed ram spermatozoa. *Society for Reproduction and Fertility* 2004; 1741–7899 (online). DOI: 10.1530/rep.1.00075
185. Moura A.A., Koc H., Chapman D.A., Killian G.J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *Journal of Andrology* 2006; 27: 201-211
186. Moura A.A., Chapman D.A., Koc H., Killian G.J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocytepenetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. *Molecular Reproduction and Development* 2007; 74: 214-222.
187. Nedyalka V., Emma M. Stabilization of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2001; 103(11): 752-767.

188. Neto C.R., Castro-Chaves M.M.B., Sancler-Silva Y.F.R, Uliani R.C, Oliveira P.V.L., Freitas-Dell'aqua C.P., Papa F.O., Alvarenga M.A. Are “bad freezer” stallions also “bad cooler” stallions? *Reproduction, Fertility and Development*. 2014; 27(1): 125-126
189. Nogueira B.G., Sampaio B.F., Souza M.I., Costa E.V., Zúccari C.E. Coenzyme Q10 and  $\alpha$ -Tocopherol Prevent the Lipid Peroxidation of Cooled Equine Semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 2015; 50(6):1003-10.
190. Nouri M., Ghasemzadeh A., Farzadi L., Shahnazi V., Ghaffari M. Vitamins C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of asthenoteratozoospermic and normozoospermic men. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2008; 6 (1): 1-5
191. Novak S., Smitha T. A., Paradisa F., Burwashb L., Dycka M. K, Foxcrofta G.R, Dixona W.T. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology*. 2010; 74: 956 – 957.
192. O’Flaherty C., Beconi M., Beorlegui N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia* 1997; 29(5): 269-75.
193. Ogbuewa I., Aladi N.O., Etuk I.F., Opara M.N., Uchegbu M.C., Okolil C., et al. Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. *Journal of Veterinary Science*. 2010; 3 (3): 138-164.
194. Oldenhof H., Gojowsky M., Wang S., Henke S., Yu C., Rohn K., Wolkers W.F., Sieme H. Osmotic Stress and Membrane Phase Changes During Freezing of Stallion Sperm: Mode of Action of Cryoprotective Agents. *Biology of Reproduction*. 2013; 88(3): 68, 1–11
195. O’Leary S., Jasper M.J., Warnes G.M., Armstrong D.T., Robertson S.A. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction*. 2004; 128: 237–247.

196. Olsson A.Y., Lilja H., Lundwall A. Taxon-specific evolution of glandular kallikrein genes and identification of a progenitor of prostate-specific antigen. *Genomics* 2004; 84: 147–56
197. Omu A.E., Fatinikum T., Mannazhath N., Abraham S. Significance of simultaneous determination of serum and seminal plasma alpha-tocopherol and retinol in infertile men by high-performance liquid chromatography. *Andrologia* 1999; 31: 347–354.
198. Orief Y., Schultze-Mosgau A., Dafopoulos K., Al-Hasani S. Vitrification: will it replace the conventional gamete cryopreservation techniques? *Middle East Fertility Society Journal* 2005; 10(3): 171-184.
199. Ortega-Ferrusola C., García B., Gallardo-Bolaños J., González-Fernández L., Rodríguez-Martinez H., Tapia J., et al. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2009; 114(4): 393–403.
200. Ortega-Ferrusola C., González Fernandez L., Salazar Sandoval C., Macias Garcia B., Rodríguez Martinez H., Tapia J.A., Peña F.J. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces “apoptosis like” changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 2010; 74: 458–465.
201. Pahune P.P., Choudhari A.R., Muley P.A. The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2013; 7(6): 991–5.
202. Pan Q., Ju Z., Huang J., Zhang Y., Qi C., Gao Q., Zhou L., Li Q., Wang L., Zhong J., Liu M., Wang C. PLCz functional haplotypes modulating promoter transcriptional activity are associated with semen quality traits in Chinese Holstein bulls. *PLoS ONE* 2013; 8(3): e58795.
203. Pappas R.S., Newcomer M.E., Ong D.E. Endogenous retinoids in rat epididymal tissue and rat and human spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1993; 48: 235–247.

204. Parlevliet J.M., Pearl C.A., Hess M.F., Famula T.R., Roser J.F. Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymidis. *Theriogenology* 2006; 66: 755–765.
205. Paz V.D.A. Plan de empresa para la creación criadero de equinos “criadero hermanos Paz Valdés. Proyecto de emprendimiento para optar al título de Administrador de Empresas. Universidad Autónoma de Occidente. 2013.
206. Pegg D.E. Principles of cryopreservation. *Methods in Molecular Biology*. 2007; 368: 39–57
207. Peirouvi T., Gholamhossein F., Soleimani J.R., Ghaffari M.N. Vitrification induced apoptosis in spermatozoa from fertile and subfertile men. *Iranian Journal of Reproduction Medicine*. 2007; 5 (3): 117-120.
208. Peña F.J., Macías-García B.M., Samper J.C., Aparicio I.M., Tapia J.A., Ferrusola C.O. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*. 2011; 76:1177–1186.
209. Pérez-Pé R., Grasa P., Fernandez-Juan M., Peleato M.L., Cebrian-Pérez J.A., Muiño-Blanco T. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 2002; 61:226–233.
210. Pesch S.K. Light- and electron microscopic studies on stallion ejaculate and biochemical analyses of seminal plasma. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen, Germany. 2005
211. Pesch S., Bergmann M., Bostedt H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology*. 2006; 66: 307–313
212. Pessanha M.A, Straggiotti J.F, Fagundes B., Costa J.R, Valente de Souza G., Shimoya A. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2008; 37 (12): 2115-2119.

213. Pizarro L.E, Restrepo B.G, Echeverry Z.J, Rojano B. Efecto del plasma seminal sobre el estado redox del semen equino criopreservado. *Revista MVZ Córdoba*. 2013; 18 (Supl):3672-3680.
214. Pokorný J. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology* 2007; 109: 629-642.
215. Pommer A.C., Rutllant J., Meyers S.A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology*. 2002; 58(7):1373-1443.
216. Ponglowhapan S., Essén-Gustavsson B., Forsberg C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 2004; 62(8):1498-1517.
217. Portus B., Reilas T., Katila T. Effect of seminal plasma on uterine inflammation, contractility and pregnancy rates in mares. *Equine Veterinary Journal*. 2005; 37:515-519.
218. Prasad A.S., Bao B., Beck F.W.J., Kuck O., Sarkar F.H. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 37: 1182-1190.
219. Primakoff P., Myles D.G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends in Genetics* 2000; 16, 83–87.
220. Prior R., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005; 53(10):4290-4302.
221. Rahman, K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Journal of Clinical Interventions in Aging* 2007; 2: 219-236.
222. Ratto M.H., Huanca W., Singh J., Adams G.P. Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005; 3: 29–33.



223. Raudsepp T., Santani A., Wallner B., Kata S.R., Re C., Zhang H.-B., Womack J.E., Skow L.C., Chowdhary B.P. A detailed physical map of the horse Y chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 9321–9326.
224. Raudsepp T., Paria N., Durkin K., Murphy W., Chowdhary B.P. A detailed physical map of the horse Y chromosome. *Plant and Animal Genome XV*, San Diego, CA, W110. 2007
225. Raudsepp T., McCue M.E., Das P.J., Dobson L., Vishnoi M., et al. Genome-wide association study implicates testis-sperm specific FKBP6 as a susceptibility locus for impaired acrosome reaction in stallions. *PLoS Genet* 2012; 8: e1003139
226. Rebolledo A.D., Sierra L.N., Tamayo A.C., Loria A.A., Denis S.E., Osés RB, Parra E.G., Monsreal L.P., Ugalde J.R. Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted with seminal plasma. *Revista Científica*. 2007; 17: 73–76.
227. Reddy N.S.S, Mohanarao G.J., Atreja S.K. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalua bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 2010; 119: 183–190.
228. Reinert M., Calvete J.J., Sanz L., Mann K., Töpfer-Petersen E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *European Journal of Biochemistry*. 1996; 242: 636-40.
229. Restrepo G., Zapata K., Rojano B. Evaluación de la capacidad antioxidante total del plasma seminal equino. *Zootecnia Tropical*. 2015; 31 (1): 79-87.
230. Richard D., Kefi K., Barbe U., Bausero P., Visioli F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacological Research* 2008; 57: 451–455

231. Robertson S.A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell and Tissue Research*. 2005; 322: 43–52.
232. Rodriguez A., Losada V., Larraín M.A., Quitral V., Vinagre J., Aubourg S.P. Development of lipid changes related to quality loss during the frozen storage of farmed coho salmon. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2007; 84: 727-734.
233. Rodriguez H., Wallgren M. Advances in Boar Semen Cryopreservation. *Veterinary Medicine Internacional* 2011; 1-5.
234. Roser J.F. Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Animal Reproduction Science* 2008; 107: 179–196
235. Rossi M., Falomo M.E., Mantovani R. Role of coenzyme Q and vitamin E on stallion semen motility evaluated both in frozen and cooled-stored semen. *Italian Journal of Animal Science* 2016; 15(4): 595 – 603.
236. Sabeur K., Ball B. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. *Reproduction*. 2007; 134: 263–270.
237. Saki G., Rahim F., Zergani M. Vitrification of small volume of normal human sperms: use of open pulled straw carrier. *Journal of Medical Science*. 2009; 9(1): 30-35.
238. Samuel C.S., Tian H., Zhao L., Amento E.P. Relaxin is a key mediator of prostate growth and male reproductive tract development. *Laboratory Investigation* 2003; 83: 1055–1067.
239. Sánchez R., Cartagena P., Berland O. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Revista de Investigación Veterinaria del Perú*. 2006; 17(1):1-7.
240. Sang L., Du Q.Z., Yang W.C., Tang K.Q., Yu J.N., Hua G., Zhang, X.X., Yang L.G. Polymorphisms in follicle stimulation hormone receptor, inhibin alpha,

- inhibin beta A, and prolactin genes, and their association with sperm in Holstein bull. *Animal Reproduction Science* 2011; 126:151-156.
241. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2004; 2:1-18.
242. SAPA, Sociedad Argentina de Producción Animal. Equinos, Agroalimentos Argentinos II [citado 3 de Junio de 2011]. Disponible en: URL: [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_equinos/curso\\_equinos\\_I/10-produccion\\_equinos\\_aacrea.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_equinos/curso_equinos_I/10-produccion_equinos_aacrea.pdf)
243. Sardoy M.C., Carretero M.I., Neild D.M. Evaluation of stallion sperm DNA alterations during cryopreservation using toluidine blue. *Animal Reproduction Science*. 2008; 107(3-4): 349–350
244. Schambony A., Gentzel M., Wolfes H., Raida M., Neumann U, Topfer-Petersen E. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1387:206–216.
245. Schrimpf R., Dierks C., Martinsson G., Sieme H., Dist O. Genome-Wide Association Study Identifies Phospholipase C zeta 1 (PLCz1) as a Stallion Fertility Locus in Hanoverian Warmblood Horses. *PLoS ONE* 2014; 9(10): e109675. doi:10.1371/journal.pone.0109675
246. Skandhan K.P., Mazumdar B.N., Sumangala B. Study into the iron content of seminal plasma in normal and infertile subjects. *Urología*. 2012; 79(1): 54 – 57.
247. Shah K., Sivapalan G., Gibbons N., Tempest H., Griffin D.K. The genetic basis of infertility. *Reproduction* 2003; 126: 13–25.
248. SIEMBRA, Portal del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de la Republica de Colombia [citado 20 de Abril de 2013]. Disponible en: URL: <http://www.siembra.gov.co/>
249. Silva P.F.N. Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. PhD thesis. Utrecht University, Ridderprint, Ridderkerk 2006; 5-36.

250. Song G.J., Norkus E.P., Lewis V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. *International Journal of Andrology* 2006; 29: 569-575.
251. Sostaric E., Aalberts M., Gadella B.M., Stout T.A.E. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal Reproduction Science* 2008; 107: 237–248.
252. Souza C.E., Moura A.A., Monaco E., Killian G.J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Animal Reproduction Science*. 2008; 105: 72–89.
253. Squires E.L. Semen cryopreservation - challenges and perspectives. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2013; 37(2): 136-139
254. Storey B.T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *International Journal of Developmental Biology* 2008; 52 (5-6): 427–437.
255. Sunnotel O., Hiripi L., Lagan K., McDaid J.R., De Leon J.M., et al. Alterations in the steroid hormone receptor co-chaperone FKBP are associated with male infertility: a case-control study. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010; 8: 22.
256. Swann K., Saunders C.M., Rogers N.T., Lai F.A. PLC $\zeta$  (zeta): a sperm protein that triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations and egg activation in mammals. *Cell and Developmental Biology* 2006; 17: 264–273.
257. Swann K., Lai F.A. PLC $\zeta$  and the initiation of Ca(2+) oscillations in fertilizing mammalian eggs. *Cell Calcium* 2013; 53: 55–62
258. Tabassum A., Bristow R.G., Venkateswaran V. Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: A good thing? *Cancer Treatment Reviews* 2010; 36: 230-234.

259. Tardif S., Wilson M.D., Wagner R., Hunt P., Gertsenstein M., Nagy A., Lobe C., Koop B.F., Hardy, D.M. Zonadhesin is essential for species specificity of sperm adhesion to the egg zona pellucida. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 24863-24870.
260. Therond P., Auger J., Legrand A. y Jouannet P. a-tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Molecular Human Reproduction* 1996; 2 (10): 739-744
261. Thomas A., Meyers S., Ball B. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* 2006; 65(8):1531-1550.
262. Thompson C.H., Thompson D.L., Kincaid L.A., Nadal M.R. Prolactin involvement with the increase in seminal volume after sexual stimulation in stallions. *Journal of Animal Science* 1996; 74: 2468–2472.
263. Töpfer-Petersen E., Ekhlesi-Hundrieser M., Kirchhoff C., Leeb T., Sieme H. The role of stallion seminal plasma proteins in fertilization. *Animal Reproduction Science*. 2005; 89: 159–170.
264. Toulis K.A., Iliadou P.K., Venetis C.A., Tsametis C., Tarlatzis B.C., Papadimas I., Goulis D.G. Inhibin B and anti-Mullerian hormone as markers of persistent spermatogenesis in men with non-obstructive azoospermia: a meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Human Reproduction Update* 2010; 16 (6): 713-724.
265. Troedsson M.H.T, Lee C.S, Franklin R., Crabo B.G. The role of seminal plasma in post-breeding uterine inflammation. *Journal of Reproduction and Fertiity*. 2000; 56 (Suppl.): 341–349.
266. Troedsson M.H.T., Desvousges A.S., Alghamdi B., Dahms C.A., Dow J., Hayna R., Valesco P.T., Collahan M.L., Macpherson M., Pozor M., Buhi W.C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*. 2005; 89:171-186.

267. Turner R.M.O. and McDonnell S. Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. *Theriogenology* 2003; 60: 1-10
268. Turunen M., Olsson J., Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1660: 171-199.
269. Udby L., Bjartell A., Malm J., Egesten A., Lundwall K., Cowland J.B, Borregaard N. & Kjeldsen I. Characterization and Localization of Cysteine-Rich Secretory Protein 3 (CRISP-3) in the Human Male Reproductive Tract. *Journal of Andrology* 2005; 26 (3),333-342.
270. Usuga A., Restrepo G., Rojano B. Criotolerancia del Semen Equino, Estabilidad Oxidativa y Componentes del Plasma Seminal. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 2016; 27(3): 505-517.
271. Uysal O., Bucak M.N. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brno* 2007; 76 (3): 383–390.
272. Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004; 266, 37-56.
273. Varela E.G., Duque J.E.C., Ramirez M.H., Ocampo D.V., Montoya J.D.P., Restrepo G.B. Efecto de cuatro métodos de separación seminal sobre la calidad y la capacidad fertilizante in vitro de espermatozoides equinos criopreservados. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2015; 26(3): 451-461
274. Vasconcelos J., Chaveiro A., Góis A., Moreira da Silva F. Effects of atocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science* 2013; 33: 787-793
275. Vickers M.H., Casey P.J., Champion Z.J., Gravance C.G., Breier B.H. IGFI treatment increases motility and improves morphology of immature spermatozoa in the GH-deficient dwarf (dw/dw) rat. *Growth Hormone & IGF Research*. 1999; 9:236–240.

276. Vidament M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction*. 2005; 89: 115–136.
277. Villa N.A, Castaño D., Duque P.C, Ceballos A. Glutathione Peroxidase and Superoxide Dismutase activities in blood and seminal plasma in colombian stallions. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2012; 25: 64-70
278. Villemure M., Lazure C., Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003; 1: 39–48.
279. Waheed M., El-Bahr S.M., Al-haider A.K. Influence of Seminal Plasma Antioxidants and Osteopontin on Fertility of the Arabian Horse. *Journal of Equine Veterinary Science* 2013; 33: 705-709
280. Wilhelm D., Palmer S., Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews* 2007; 87: 1–28.
281. Williams C., Carlucci S. Oral vitamin E supplementation on oxidative stress, vitamin and antioxidant status in intensely exercised horses. *Equine Veterinary Journal* 2006; 36: 617-621.
282. Wnuk M., Lewinska A., Oklejewicz B., Bartosz G., Tischner M., Bugno-Poniewierska M. Redox status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude of DNA damage in sperm cells. *Theriogenology*. 2010; 74: 1677–1684
283. Wong W.Y., Flik G., Groenen P.M.W., Swinkles D.W., Thomas C.M.G., Copius-Peereboom J.H.J., et al. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reproductive Toxicology*. 2001; 15: 131-6.
284. Yang W.C., Tang K.Q., Yu J.N., Zhang C.Y., Zhang X.X., Yang L.G. Effects of Mbol1 and BspMI polymorphisms in the gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) gene on sperm quality in Holstein bulls. *Molecular Biology Reports* 2011; 38(5): 3411-3415

285. Yildiz S., Öztürkler Y., Ari U.C., Lehimcioğlu N.C., Atakişi E., Kulaksiz R. The Effects of L-Ergothioneine, N-acetylcystein and Cystein on Freezing of Ram Semen. *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas* 2015; 21 (1): 81-86
286. Yoshida Y., Niki E., Noguchi N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and Physics of Lipids* 2003; 23: 63–75.
287. Yousefian I., Zare-Shahneh A., Zhandi M. The effect of coenzyme q10 and a-tocopherol in skim milk–based extender for preservation of caspian stallion semen in cool condition. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2014; 34: 949-954.
288. Zaabal M.M, Ahmed W.M. Monitoring of gene markers associated with fertility in Purebred Arabian stallions. *Journal of Reproduction and Infertility* 2010; 2: 41 – 44.
289. Zhang J.G., Nicholls-Grzemeski F.A., Tirmenstein M.A., Fariss M.W. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. *Chemico-Biological Interactions*. 2001; 138: 267–284.
290. Zhao J., Dong X., Hu K., Long Z., Wang L., Liu Q., et al. Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* 2016; 6: Article number: 22386.
291. Zubkova E.V., Robaire B. Effect of glutathione depletion on antioxidant enzymes in the epididymes, seminal vesicles, and liver and on spermatozoa motility in the aging brown Norway rat. *Biology of Reproduction* 2004; 71: 1002–1008



## 2. Capítulo 2. Association of the CRISP-3 protein and some of its polymorphisms with the quality of cryopreserved stallion semen

Este capítulo corresponde al objetivo específico: “**Determinar las variantes genóticas para algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) dentro del gen CRISP-3 en equinos de la raza criollo colombiano y su asociación con la calidad de semen criopreservado**”

A. Usuga<sup>a\*</sup>, B. Rojano<sup>b</sup>, G. Restrepo<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, CES University, Medellín, Colombia. E-mail: [ausuga@ces.edu.co](mailto:ausuga@ces.edu.co)

<sup>b</sup> Faculty of Sciences, School of Chemistry, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. E-mail: [brojano@unal.edu.co](mailto:brojano@unal.edu.co)

<sup>c</sup>Faculty of Agricultural Sciences, Department of Animal Science, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. E-mail address: [grestre0@unal.edu.co](mailto:grestre0@unal.edu.co)

\* *Corresponding author. School of Veterinary Medicine and Animal Science, CES University, address: Calle 10A #22-04, Medellín, Colombia.*

*Artículo presentado en el formato de la revista Animal Genetics, a la que fue sometido.*

### **Abstract**

Contribution of seminal plasma proteins to freezability has been reported in males of several species, suggesting these proteins as genetic markers. The aim of this study was to evaluate single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the CRISP-3 gene, as well as this protein in the seminal plasma, and their relation with post-thawing semen quality in stallions. DNA was obtained from 100 stallions, interest regions were PCR

amplified and directly sequenced. SNPs within the equine CRISP-3 gene evaluated, were CRISP3c.+199A>G (SNP1), CRISP3c.+566C>A (SNP2), CRISP3c.+622G>A (SNP3) and CRISP3c.+716A>G (SNP4). CRISP-3 protein content in seminal plasma was determined by ELISA. Semen from 30 stallion was cryopreserved and post-thaw total motility (TM), progressive motility (PM), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), abnormal morphology (AM), sperm vitality (SV), and membrane integrity (MI) were evaluated. Generalized linear models were fitted for seminal quality parameters. Means between genotypes, haplotypes and CRISP-3 levels, were compared using the Tukey's test. Correlation and regression analysis were performed. For SNP1 and SNP3, AA genotype had highest results for TM, PM and MI; for SNP2, the best results for TM, PM and AM were obtained by CC genotype. For SNP4, GG genotype had the lowest results for all parameters, except for MI. A high level of CRISP-3 protein in seminal plasma, had the best results for TM, PM, VSL, BCF, SV and AM. In conclusion, there was a relation between CRISP-3 genotype and seminal plasma protein and post-thawing semen quality in stallions.

**Keywords:** CRISP-3, semen, cryotolerance, stallion

## 2.1 Introduction

Frequently, selection of stallions used for breeding is based on genetics, desired performance and conformational characteristics (Novak *et al.* 2010), whereas quantitative reproduction performance traits have not been used as selection criteria in this species (Hamann *et al.* 2007). Genetic markers associated with the reproductive performance or semen quality traits could be used in the selection of breeding stallions, being a promising goal (Novak *et al.* 2010). In recent years, research efforts have focused on identifying reliable markers of stallion fertility at either the genomic or proteomic level (Giesecke *et al.* 2011; Jobim *et al.* 2011; Schrimpf *et al.* 2014). Increasing evidence indicates important roles of a family of cysteine rich secretory proteins (CRISPs), expressed in the male genital tract and secreted into the seminal plasma, where they may bind to the surface of spermatozoa (Udby *et al.* 2005; Hamann *et al.* 2007). They probably contribute to the process of sperm maturation, which is necessary for the immobile testicular sperm to gain their motility and fertilizing capacity (Dacheux *et al.* 2005). In contrast to all other investigated mammals, stallions produce huge

amounts of CRISP-3 in their genital tract and represents a major fraction of equine seminal plasma protein, being secreted primarily from the ampulla, vas deferens and seminal vesicles (Schambony *et al.* 1998). This unique species-specific expression profile suggests that CRISP3 has a special role in equine reproduction (Hamann *et al.* 2007). Different polymorphisms have been identified within the CRISP-3 gene, in Hanoverian stallions; and was found that stallions heterozygous for the CRISP3 c. +622G>A single nucleotide polymorphism (SNP), had lower fertility than homozygous stallions, presenting a pregnancy rate per cycle 7% lower (Hamann *et al.* 2007). Also, proteomic studies have shown a positive association of the CRISP-3 protein with first cycle conception rate (Novak *et al.* 2010) and with stallions with high semen freezability (Jobim *et al.* 2011). The aim of this study was to evaluate some single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the CRISP-3 gene, as well as the presence of this protein in the seminal plasma, and their relation with post-thawing semen quality in stallions.

## **2.2 Materials and Methods**

### **2.2.1 Samples collection**

DNA used in this study was obtained from blood samples of 100 Colombian Creole horses (*Equus caballus*), located in Antioquia, Colombia. For their collection, a puncture was made in the jugular vein under correct asepsis conditions, and a tube with anticoagulant (EDTA) was used. Samples were transported at a temperature of 4 °C. From these animals, 30 stallions were randomly selected to obtain two ejaculates (sperm fraction) per animal, for a total of 60 ejaculates. The age of the animals ranged from 5 to 8 years. Semen samples were collected from them at least once a week, and their fertility was confirmed by their living offspring. The body condition score of the horses ranged from 6 to 7 (scale ranges from 1 to 9). For semen collection, a Missouri model (Minitube, Tiefenbach, Germany) artificial vagina lubricated with non-spermicidal gel and a mare were used. The gel fraction of the ejaculate was removed by filtration. The volume of each ejaculate was evaluated with a graduated cylinder. Spermatozoa concentration was assessed from a drop of fresh semen using a photometer (Spermacue®, Minitube, Tiefenbach, Germany) and sperm motility using a phase contrast microscope Eclipse E200 (Nikon Inc.), obtaining the average of five observation fields (400X). Semen was

diluted 1:1 with EquiPlus® (Minitube) and was transported at 5°C in an Equitainer® (Minitube).

### **2.2.2 SNPs evaluation**

Genomic DNA was extracted from blood using the DNeasy Blood & Tissue Kit- 250 (Qiagen). SNPs within the equine CRISP-3 gene, included in this study, were CRISP3c.+199A>G (SNP1), CRISP3c.+566C>A (SNP2), CRISP3c.+622G>A (SNP3) and CRISP3c.+716A>G (SNP4), previously reported by Hamann *et al.* (2007). To identify the SNPs variation, interest regions were PCR amplified and directly sequenced. Primers were designed using publicly available equine genomic sequences (AJ459965; Giese *et al.* 2002). Primer sequences and PCR conditions are given in Table S1 (Appendix 1). PCR products were verified by electrophoresis (2% agarose gel). DNA sequences were analyzed for polymorphisms with Sequencher 4.10.1 Software (Gene Codes Corporation). For the allele and genotype frequencies determination, the proportion of each form for each polymorphism within the CRISP-3 gene was estimated, respect to the total number of copies of the animals included in the study. Homozygous and heterozygous animals were identified, and the frequency of each allele was calculated (Hartl, 2000). Haplotypes were derived from the different combinations of the genotypic frequencies obtained for the SNPs.

### **2.2.3 CRISP-3 protein assessment**

CRISP-3 content was determined by ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), by Horse CRISP-3 ELISA Kit (MBS905052). For this, 1 mg of lyophilized seminal plasma were diluted with 200 µL of ultrapure water to prepare a stock solutions of samples. Results were determined with a Multiskan GO™ (Thermo Scientific™) microplate reader and analyzed with Curve Expert 1.4 Software (Copyright © 2013 Daniel G. Hyams)

## 2.2.4 Semen cryopreservation

Semen cryopreservation was performed using a rapid freezing protocol. Diluted semen was centrifuged during 15 minutes at 280 x g, and the supernatant was discarded. The precipitate was extended for a final concentration of  $100 \times 10^6$  sperm per mL, in EquiPlus® supplemented with 5% of egg yolk, 5% dimethylformamide (Sigma--Aldrich, St. Louis, USA) and 2 mg/mL of lyophilized seminal plasma. Subsequently, semen was maintained in refrigeration at 5 °C during 30 minutes and then packed in straws of 0.5 ml (V2 Dual MRS1, IMV Technologies). A controlled curve (Crysalys Cryocontroller PTC-9500) at cooling rate of -8°C/min between 5°C and -6 °C was performed. Then at cooling rate of -0.6 °C/min for 43.3 min between -6°C and -32 °C was performed. Straws were stored in a liquid nitrogen tank at -196 °C.

## 2.2.5 Semen quality evaluation

Post-thaw sperm quality was evaluated by the methods described below. Seminal motility was assessed using a computer-assisted sperm analysis (CASA), according to a modified protocol reported by Restrepo *et al.* (2013). The Sperm Class Analyzer (SCA®) Motility and Concentration (Microptic SL) software was used, and the parameters analyzed were: total motility (TM), progressive motility (PM), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), amplitude of lateral head displacement (ALH) and beat cross frequency (BCF). Abnormal morphology (AM) was assessed using the modified eosin-nigrosin test (Brito *et al.* 2011). A droplet of semen and a droplet of eosin-nigrosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) were placed on a microscope slide, mixed, smeared and placed on a warming plate at 37 °C. Subsequently, 200 spermatozoa were assessed individually in an Eclipse E200 (Nikon Inc., Tokyo, Japan) phase contrast microscope. Functional integrity of the cell membrane (MI) of the spermatozoa was assessed using the hypo-osmotic swelling test (HOS) (Neild *et al.* 1999). To achieve this, 100 µL of semen were added to a tube with 500 µL of a hypo-osmotic sucrose solution 5.4% (100 mOs mol/L). This mixture was incubated at 38.5°C for 30 minutes. Then the reaction of 200 spermatozoa was assessed in at least 5 fields of observation using an Eclipse E200 (Nikon Inc., Tokyo, Japan) phase contrast microscope. Sperm vitality (SV) was determined by the method described by Gamboa *et al.* (2010) with the Live/Dead kit (Molecular Probes Inc). To achieve this, 200 uL of semen were suspended in Hanks Heppes solution with 1% bovine serum albumin for a

concentration of approximately  $20 \times 10^6$  sperm/mL. Then, the mixture was incubated at 37 °C for 8 minutes, with 6 mM SYBR14. Subsequently, it was incubated in the same manner, with 0.48 mM propidium iodide. Then, from a sample of 5 uL, 200 sperm count was performed using a UV-2A filter of a fluorescence microscope with HBO-E200 (Nikon Inc.).

### 2.2.6 Statistical analysis

A generalized linear model (GLM) was fitted for each seminal quality parameter (dependent variable). The quartile distribution of the results for CRISP-3 was calculated, from which three levels (low, medium and high) were established. The means between genotypes for each SNP, between haplotypes and CRISP-3 levels, were compared using the Tukey's test. To evaluate the allele substitution effect, a linear regression model was used and the means were evaluated. A Pearson correlation analysis between semen quality variables and CRISP-3 protein was performed. The magnitude of the relationship between variables was evaluated by regression analysis. Given the use of parametric tests, data normality was assessed with the Shapiro-Wilk test. The significance level used for all assessments was  $P < 0.05$ . All analyzes were conducted using SAS version 9.2. Software (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

## 2.3 Results and Discussion

CRISP-3 gene encodes a member of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family, characterized by a high content of cysteine residues (16 of a total of 220–230 amino acids) that form 8 intramolecular disulfide bonds (Udby *et al.* 2005). Although originally described in the male rodent genital tract, CRISPs are expressed in a variety of mammalian tissue and cell types. Equine CRISP-3 is transcribed and expressed in the stallion salivary gland, in the ampulla and the seminal vesicle (Schambony *et al.* 1998). Hamann *et al.* (2007), based on sequence data from all exons of the equine CRISP-3 gene, identified some polymorphic sites. Results of the allele and genotype frequencies of the non-synonymous SNPs, evaluated in 100 Colombian Creole horses are described in Table 2-1.

**Table 2-1.** Allele and genotype frequencies for SNPs

<i>Polymorphism</i>	<b>Exon</b>	<b>Amino-Acid Substitution</b>	<b>Allele Frequencies</b>	<b>Genotype Frequencies</b>
<i>CRISP3c.+199A&gt;G</i>	4	Lys67Glu	0.595(A):0.405(G)	0.40(AA):0.39(AG):0.21(GG)
<i>CRISP3c.+566C&gt;A</i>	7	Thr189Lys	0.645(C):0.355(A)	0.46(CC):0.37(AC):0.17(AA)
<i>CRISP3c.+622G&gt;A</i>	8	Glu208Lys	0.965(G):0.035(A)	0.94(GG):0.05(AG):0.01(AA)
<i>CRISP3c.+716A&gt;G</i>	8	Gln239Arg	0.700(A):0.300(G)	0.50(AA):0.40(AG):0.10(GG)

There are few reports evaluating these polymorphisms in the equine species. In the present study, all possible genotype frequencies for the selected polymorphisms were found (Table 2-1), unlike Hamann *et al.* (2007), who found only the A allele for SNP1 in a sample of 107 Hanoverian horses. Despite this, certain similarities were found between both studies; the AA genotype was the least presented for SNP2 and SNP3 (17% and 1% for the present study and 21% and 2% for Hamann *et al.* 2007, respectively). In this last SNP, the GG genotype was found with the highest frequency in both reports (94% and 87% respectively). For SNP4, the AA genotype obtained the highest presentation (50%), while the GG the lowest (10%), similar to that reported by Hamann *et al.* (2007). All SNPs included in the present study are non-synonymous, which means that are found within CRISP-3 protein coding regions, thus the SNP will change a codon, and potentially change the amino acid it codes for (Hunt *et al.* 2009); this possible amino acid substitution is presented in Table 2-1.

Haplotypes found in this study are shown in Table 2-2. Haplotypes with highest presentation were 7 and 9, with a frequency of 10%; whereas the haplotypes of lowest presentation were 11, 15, 18 and 22, with a frequency of 1% each (Table 2-2).

**Table 2-2.** Haplotypes frequency and description

HAPLOTYPE	CRISP-3 GENOTYPE	FREQUENCY
1	c.+199 <b>AG</b> ;c.+566 <b>AC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AA</b>	9%
2	c.+199 <b>AG</b> ;c.+566 <b>AA</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AA</b>	6%
3	c.+199 <b>GG</b> ;c.+566 <b>AA</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AA</b>	3%
4	c.+199 <b>AA</b> ;c.+566 <b>CC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>GG</b>	2%
5	c.+199 <b>AA</b> ;c.+566 <b>AC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AA</b>	3%
6	c.+199 <b>AG</b> ;c.+566 <b>AC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AG</b>	4%
7	c.+199 <b>AG</b> ;c.+566 <b>CC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AA</b>	10%
8	c.+199 <b>AA</b> ;c.+566 <b>AA</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>GG</b>	2%
9	c.+199 <b>AA</b> ;c.+566 <b>AA</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AG</b>	10%
10	c.+199 <b>AG</b> ;c.+566 <b>CC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AG</b>	7%
11	c.+199 <b>GG</b> ;c.+566 <b>AC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>GG</b>	1%
12	c.+199 <b>AA</b> ;c.+566 <b>AC</b> ;c.+622 <b>AG</b> ;c.+716 <b>GG</b>	2%
13	c.+199 <b>AG</b> ;c.+566 <b>AC</b> ;c.+622 <b>AG</b> ;c.+716 <b>AG</b>	2%
14	c.+199 <b>GG</b> ;c.+566 <b>CC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AA</b>	9%
15	c.+199 <b>AG</b> ;c.+566 <b>CC</b> ;c.+622 <b>AA</b> ;c.+716 <b>AG</b>	1%
16	c.+199 <b>AA</b> ;c.+566 <b>AC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AG</b>	7%
17	c.+199 <b>AA</b> ;c.+566 <b>CC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AG</b>	5%
18	c.+199 <b>AG</b> ;c.+566 <b>CC</b> ;c.+622 <b>AG</b> ;c.+716 <b>AG</b>	1%
19	c.+199 <b>AA</b> ;c.+566 <b>AA</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AA</b>	3%
20	c.+199 <b>AA</b> ;c.+566 <b>CC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AA</b>	3%
21	c.+199 <b>AA</b> ;c.+566 <b>AC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>GG</b>	3%
22	c.+199 <b>GG</b> ;c.+566 <b>AA</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AG</b>	1%
23	c.+199 <b>GG</b> ;c.+566 <b>AC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AA</b>	4%
24	c.+199 <b>GG</b> ;c.+566 <b>CC</b> ;c.+622 <b>GG</b> ;c.+716 <b>AG</b>	2%

As the result of seminal quality parameters in fresh semen, a volume mean of  $39.95 \pm 25.51$  mL, a sperm concentration of  $183.45 \pm 109.57$  spermatozoa  $\times 10^6$ /mL, a motility of  $65.91 \pm 15.71\%$ , a SV of  $73.95 \pm 11.49\%$ , an AM of  $34.93 \pm 14.76\%$  and a MI of  $59.98 \pm 10.22\%$  was obtained. A decrease in the motility, vitality and integrity of the cell membrane of cryopreserved semen respect to fresh semen (Table 2-3), was observed in this study. The alterations caused by cryopreservation have been attributed to factors such as severe temperature changes, the formation and dissolution of ice crystals in the extracellular medium, osmotic and oxidative stress (Ortega-Ferrusola *et al.* 2009; Oldenhof *et al.* 2013), reducing the acrosomal integrity, viability, and motility of spermatozoa in the horse (Gibb & Aitken, 2016).



**Table 2-3.** Results of the assessment of post-thaw semen.

VARIABLE	N	MEAN	SD	CV	SE	MIN	MAX
TM (%)	300	44.81	15.15	33.81	0.87	14.29	89.81
PM (%)	300	25.88	12.05	46.56	0.69	5.62	68.02
VCL ( $\mu\text{M/S}$ )	300	73.23	16.83	22.98	0.97	14.42	119.1
VSL ( $\mu\text{M/S}$ )	300	39.41	12.82	32.54	0.74	11.03	78.57
VAP ( $\mu\text{M/S}$ )	300	54.31	14.97	27.56	0.86	11.49	100.68
ALH ( $\mu\text{M}$ )	300	2.77	0.61	22.04	0.03	0.51	4.15
BCF (HZ)	300	8.87	1.67	18.81	0.09	1.55	13.15
SV (%)	300	43.55	11.97	27.5	0.69	20	77
AM (%)	300	29.23	10.55	36.1	0.6	9	65
MI (%)	300	37.21	9.94	26.72	0.57	15	65

n: number of thawed straws SD: standard deviation. CV: coefficient of variation (%). SE: standard error: TM: total motility. PM: progressive motility. VCL: curvilinear velocity. VSL: straight line velocity. VAP: average path velocity. ALH: amplitude of lateral head displacement. BCF: beat cross frequency. SV: sperm vitality. AM: abnormal morphology. MI: functional integrity of the cell membrane.

For all SNPs evaluated, except for SNP4, heterozygous genotypes had the lowest results for parameters such as TM, PM, SV, MI, VAP and the highest for AM (Table 2-4). Similar results were found by Hamann *et al.* (2007), who reported that heterozygous stallions for the SNP3 (AG) had a lower pregnancy rate per cycle (7% less), than homozygous stallions (GG). However, for the other SNPs, no significant association was found with the fertility parameters studied, unlike the present study. For SNP4, GG genotype had the lowest results for all parameters, except for MI, that was not affected by any genotype in this SNP. For SNP1 and SNP3, AA genotype had the best results for TM, PM and MI; and for VCL, VSL, VAP, SV and AM in the case of the SNP3. For SNP2, the best results for parameters like TM, PM and AM were obtained by the CC genotype, while the higher SV, VCL and ALH were found for AA genotype (Table 2-4).

**Table 2-4.** Post-thaw semen assessment by CRISP3 genotypes

	GENOTYPE	N	TM	PM	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF	SV	AM	MI
<b>SNP1</b>	AA	90	51.8 <sup>a</sup>	31.1 <sup>a</sup>	70.2 <sup>b</sup>	41.0 <sup>a</sup>	52.7 <sup>b</sup>	2.63 <sup>c</sup>	8.5 <sup>b</sup>	47.0 <sup>a</sup>	29.0 <sup>b</sup>	40.7 <sup>a</sup>
	AG	160	41.0 <sup>c</sup>	22.7 <sup>c</sup>	72.2 <sup>b</sup>	38.6 <sup>b</sup>	54.2 <sup>ab</sup>	2.76 <sup>b</sup>	8.8 <sup>b</sup>	40.5 <sup>b</sup>	30.8 <sup>a</sup>	34.8 <sup>c</sup>
	GG	50	44.0 <sup>b</sup>	26.4 <sup>b</sup>	81.7 <sup>a</sup>	39.1 <sup>ab</sup>	57.2 <sup>a</sup>	3.04 <sup>a</sup>	9.5 <sup>a</sup>	46.9 <sup>a</sup>	24.3 <sup>c</sup>	38.4 <sup>b</sup>
<b>SNP2</b>	AA	90	46.8 <sup>b</sup>	26.8 <sup>b</sup>	76.6 <sup>a</sup>	40.3 <sup>a</sup>	55.0 <sup>a</sup>	2.99 <sup>a</sup>	9.2 <sup>a</sup>	50.4 <sup>a</sup>	28.7 <sup>b</sup>	39.8 <sup>a</sup>
	AC	100	37.9 <sup>c</sup>	20.3 <sup>c</sup>	71.2 <sup>b</sup>	35.9 <sup>b</sup>	51.3 <sup>b</sup>	2.75 <sup>b</sup>	8.9 <sup>ab</sup>	37.4 <sup>c</sup>	32.7 <sup>a</sup>	33.1 <sup>b</sup>
	CC	110	49.3 <sup>a</sup>	30.1 <sup>a</sup>	72.2 <sup>b</sup>	41.7 <sup>a</sup>	56.4 <sup>a</sup>	2.60 <sup>c</sup>	8.5 <sup>b</sup>	43.4 <sup>b</sup>	26.4 <sup>c</sup>	38.7 <sup>a</sup>
<b>SNP3</b>	AA	10	74.6 <sup>a</sup>	50.2 <sup>a</sup>	88.3 <sup>a</sup>	47.5 <sup>a</sup>	71.7 <sup>a</sup>	2.98 <sup>a</sup>	8.0 <sup>b</sup>	58.9 <sup>a</sup>	20.9 <sup>c</sup>	54.2 <sup>a</sup>
	AG	20	32.9 <sup>c</sup>	15.3 <sup>c</sup>	63.5 <sup>c</sup>	35.6 <sup>b</sup>	46.6 <sup>c</sup>	2.60 <sup>b</sup>	8.3 <sup>ab</sup>	33.8 <sup>c</sup>	42.8 <sup>a</sup>	27.2 <sup>c</sup>
	GG	270	44.5 <sup>b</sup>	25.7 <sup>b</sup>	73.3 <sup>b</sup>	39.3 <sup>b</sup>	54.2 <sup>b</sup>	2.77 <sup>ab</sup>	8.9 <sup>a</sup>	43.7 <sup>b</sup>	28.5 <sup>b</sup>	37.3 <sup>b</sup>
<b>SNP4</b>	AA	150	45.0 <sup>a</sup>	25.5 <sup>b</sup>	76.3 <sup>a</sup>	40.1 <sup>a</sup>	56.0 <sup>a</sup>	2.94 <sup>a</sup>	9.2 <sup>a</sup>	45.2 <sup>a</sup>	28.2 <sup>b</sup>	37.8 <sup>a</sup>
	AG	110	46.7 <sup>a</sup>	27.6 <sup>a</sup>	72.2 <sup>b</sup>	40.9 <sup>a</sup>	55.1 <sup>a</sup>	2.69 <sup>b</sup>	8.8 <sup>a</sup>	44.0 <sup>a</sup>	28.0 <sup>b</sup>	36.1 <sup>a</sup>
	GG	40	38.7 <sup>b</sup>	22.5 <sup>c</sup>	64.1 <sup>c</sup>	32.3 <sup>b</sup>	45.5 <sup>b</sup>	2.34 <sup>c</sup>	7.5 <sup>b</sup>	35.9 <sup>b</sup>	36.1 <sup>a</sup>	37.7 <sup>a</sup>

Different letters within columns indicate statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). n: number of thawed straws. TM: total motility. PM: progressive motility. VCL: curvilinear velocity. VSL: straight line velocity. VAP: average path velocity. ALH: amplitude of lateral head displacement. BCF: beat cross frequency. SV: sperm vitality. AM: abnormal morphology. MI: functional integrity of the cell membrane.

Some of the above results are similar to those found in the allelic substitution analyzes (Table 2-5). For SNP1 and SNP4, the change of each allele A by G, is unfavorable for TM, PM, MI and VCL, VSL, VAP, ALH, BCF, SV respectively. In contrast, for SNP2 the change of the allele C by A, has a detrimental effect in PM; while is favorable for ALH, BCF and SV. For SNP3, the change of G by A is beneficial for TM and PM, supporting the findings presented in table 2-4.

**Table 2-5.** Effect of allelic substitution on post-thawing seminal quality parameters

Variable	Polymorphism			
	CRISP3c.+199A>G	CRISP3c.+566C>A	CRISP3c.+622G>A	CRISP3c.+716A>G
<b>TM</b>	-4.99*	-1.59	6.55*	-1.82
<b>PM</b>	-3.27*	-1.94*	5.04*	-0.52
<b>VCL</b>	5.18*	2.08	1.99	-5.55*
<b>VSL</b>	-1.17	-0.88	1.61	-2.68*
<b>VAP</b>	2.11	-0.86	3.58	-4.10*
<b>ALH</b>	0.18*	0.19*	0.01	-0.28*
<b>BCF</b>	0.46*	0.34*	-0.50*	-0.72*
<b>SV</b>	-1.06	3.18*	2.04	-3.73*
<b>AM</b>	-1.67	1.33	1.93	2.83*
<b>MI</b>	-1.88*	0.32	2.56	-0.49

\*Coefficient with  $p < 0.05$ . TM: total motility. PM: progressive motility. VCL: curvilinear velocity. VSL: straight line velocity. VAP: average path velocity. ALH: amplitude of lateral head displacement. BCF: beat cross frequency. SV: sperm vitality. AM: abnormal morphology. MI: functional integrity of the cell membrane

A non-synonymous SNP can drastically alter the protein function, because sometimes single amino acid difference can modify the structure/shape of a protein. It could even affect the RNA transcript itself, causing it to be translated at lower efficiency or not at all (Burke *et al.* 2007; Hunt *et al.* 2009). The findings reported in this study can support this, since a non-conservative exchange between the amino acids described (Table 2-1), in the regions of the equine CRISP3 protein might indeed alter its protein–protein binding properties, which could subsequently affect male fertility (Hamann *et al.* 2007) and its post-thawing semen quality.

From the 24 haplotypes obtained in this study, only 17 were found in the horses included in the post-thaw seminal quality evaluation (Table 2-6). The low frequencies found for some of these haplotypes (Table 2-2) could alter the results obtained for their association with the seminal quality parameters (Table 2-6). However, increasing the sample does not necessarily guarantee an increase in the frequency of these haplotypes.

**Table 2-6.** Post-thaw semen assessment by haplotypes

HAPLO	TM	PM	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF	SV	AM	MI
1	42.0 <sup>efg</sup>	23.0 <sup>de</sup>	74.1 <sup>cd</sup>	36.5 <sup>c</sup>	50.5 <sup>cde</sup>	3.0 <sup>abc</sup>	9.9 <sup>a</sup>	44.2 <sup>ef</sup>	30.5 <sup>cd</sup>	34.4 <sup>fgh</sup>
2	45.6 <sup>de</sup>	22.2 <sup>de</sup>	73.4 <sup>cd</sup>	34.2 <sup>c</sup>	52.0 <sup>cd</sup>	3.0 <sup>abc</sup>	8.6 <sup>abc</sup>	45.8 <sup>def</sup>	34.5 <sup>bc</sup>	34.8 <sup>cde</sup>
3	37.1 <sup>fgh</sup>	19.2 <sup>ef</sup>	72.7 <sup>cd</sup>	33.6 <sup>cd</sup>	47.2 <sup>de</sup>	3.1 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	51.4 <sup>bcd</sup>	28.6 <sup>d</sup>	42.3 <sup>cde</sup>
4	57.2 <sup>bc</sup>	35.5 <sup>b</sup>	32.3 <sup>f</sup>	18.4 <sup>e</sup>	24.9 <sup>f</sup>	1.1 <sup>g</sup>	4.0 <sup>d</sup>	41.8 <sup>fg</sup>	46.9 <sup>a</sup>	55.4 <sup>a</sup>
5	47.8 <sup>de</sup>	22.1 <sup>de</sup>	58.5 <sup>e</sup>	31.8 <sup>cd</sup>	42.8 <sup>de</sup>	2.7 <sup>bcde</sup>	8.9 <sup>abc</sup>	41.0 <sup>fg</sup>	27.1 <sup>def</sup>	40.7 <sup>def</sup>
6	23.1 <sup>i</sup>	10.8 <sup>g</sup>	65.4 <sup>de</sup>	34.1 <sup>c</sup>	51.4 <sup>cd</sup>	2.2 <sup>f</sup>	8.1 <sup>bc</sup>	28.3 <sup>h</sup>	37.7 <sup>b</sup>	27.2 <sup>ij</sup>
7	41.7 <sup>efg</sup>	26.2 <sup>cd</sup>	79.2 <sup>bc</sup>	47.1 <sup>ab</sup>	64.1 <sup>ab</sup>	2.6 <sup>def</sup>	8.6 <sup>abc</sup>	40.1 <sup>fg</sup>	26.8 <sup>def</sup>	33.6 <sup>ghi</sup>
8	43.0 <sup>def</sup>	29.6 <sup>c</sup>	79.8 <sup>abc</sup>	52.3 <sup>a</sup>	60.6 <sup>bc</sup>	2.9 <sup>abcde</sup>	10 <sup>a</sup>	44.5 <sup>ef</sup>	22.4 <sup>efgh</sup>	34.5 <sup>fgh</sup>
9	55.8 <sup>bc</sup>	35.5 <sup>b</sup>	81.3 <sup>abc</sup>	46.8 <sup>ab</sup>	61.2 <sup>abc</sup>	2.8 <sup>abcde</sup>	9.0 <sup>abc</sup>	56.5 <sup>ab</sup>	25.2 <sup>defg</sup>	37.4 <sup>efg</sup>
10	35.6 <sup>fgh</sup>	16.4 <sup>fg</sup>	55.9 <sup>e</sup>	31.4 <sup>cd</sup>	40.2 <sup>e</sup>	2.5 <sup>def</sup>	9.1 <sup>abc</sup>	32.1 <sup>h</sup>	28.5 <sup>d</sup>	30.2 <sup>hi</sup>
11	23.2 <sup>i</sup>	12.6 <sup>g</sup>	82.2 <sup>abc</sup>	25.4 <sup>de</sup>	52.2 <sup>cd</sup>	2.6 <sup>cde</sup>	8.2 <sup>bc</sup>	27.8 <sup>h</sup>	27.5 <sup>de</sup>	30.2 <sup>hi</sup>
12	31.2 <sup>h</sup>	12.3 <sup>g</sup>	62.1 <sup>de</sup>	33.1 <sup>cd</sup>	44.1 <sup>de</sup>	2.6 <sup>def</sup>	7.8 <sup>c</sup>	29.5 <sup>h</sup>	47.8 <sup>a</sup>	30.9 <sup>hi</sup>
13	34.5 <sup>gh</sup>	18.3 <sup>ef</sup>	64.9 <sup>de</sup>	38.2 <sup>c</sup>	49.2 <sup>de</sup>	2.5 <sup>ef</sup>	8.8 <sup>abc</sup>	38.1 <sup>g</sup>	37.9 <sup>b</sup>	23.6 <sup>j</sup>
14	61.4 <sup>b</sup>	40.6 <sup>b</sup>	90.6 <sup>ab</sup>	51.3 <sup>a</sup>	69.6 <sup>ab</sup>	3.0 <sup>ab</sup>	9.5 <sup>ab</sup>	52.1 <sup>bc</sup>	18.5 <sup>h</sup>	38.6 <sup>defg</sup>
15	74.6 <sup>a</sup>	50.2 <sup>a</sup>	88.3 <sup>ab</sup>	47.5 <sup>ab</sup>	71.7 <sup>a</sup>	2.9 <sup>abcd</sup>	8.0 <sup>c</sup>	58.9 <sup>a</sup>	20.9 <sup>gh</sup>	54.2 <sup>ab</sup>
16	69.4 <sup>a</sup>	46.6 <sup>a</sup>	91.5 <sup>a</sup>	53.2 <sup>a</sup>	70.4 <sup>ab</sup>	3.1 <sup>a</sup>	8.9 <sup>abc</sup>	48.6 <sup>cde</sup>	20.1 <sup>gh</sup>	48.2 <sup>bc</sup>
17	50.4 <sup>cd</sup>	27.1 <sup>cd</sup>	63.4 <sup>de</sup>	39.6 <sup>bc</sup>	47.8 <sup>de</sup>	2.6 <sup>bcde</sup>	9.8 <sup>a</sup>	48.4 <sup>cde</sup>	21.5 <sup>fgh</sup>	44.5 <sup>cd</sup>

Different letters within columns indicate statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). TM: total motility. PM: progressive motility. VCL: curvilinear velocity. VSL: straight line velocity. VAP: average path velocity. ALH: amplitude of lateral head displacement. BCF: beat cross frequency. SV: sperm vitality. AM: abnormal morphology. MI: functional integrity of the cell membrane.

Compared with exploring the associations of SNPs in a gene with biological traits, research on haplotype combinations between multiple SNPs may be more constructive, among which interaction among SNPs can be considered (Liu *et al.* 2016). The haplotypes that showed the best results for most of the seminal characteristics evaluated, were 15 and 16, for parameters such as TM, PM and AM for both; VAP, SV, MI and VCL, VSL, ALH respectively. In contrast, haplotypes such as 4, 6, 11 and 12 showed the lowest results for some of these parameters (Table 2-6).

The mean of CRISP-3 protein assessed was  $55.22 \pm 8.06$  ng/mg of lyophilized seminal plasma; the minimum value found was 14.86 ng/mg and the maximum was 56.14 ng/mg of lyophilized seminal plasma. This protein is present in large amounts in stallion seminal plasma (about 1 mg/mL), appearing to be a characteristic unique to this species (Udby

*et al.* 2005; Novak *et al.* 2010). Connor (2009), quantified the amount of CRISP-3 protein in 67 stallion seminal plasma samples, by ELISA, and found a mean of  $7.44 \pm 5.98$  mg/mL; the minimum amount was 0.49mg/mL and the maximum 25.63 mg/mL. In the present study the CRISP-3 measurement was performed using lyophilized seminal plasma, so the results are not comparable. However, it was established for the samples assessed that per each mL of liquid seminal plasma, was obtained a mean of 0.021 g of lyophilized product. In humans, it has demonstrated that CRISP-3 exists in 2 different molecular-weight forms of approximately 29 and 31 kDa in seminal plasma, and they both represent CRISP-3 holoprotein (Udby *et al.* 2002).

A high level of CRISP-3 protein in seminal plasma, had the best results for TM, PM, VSL, BCF, SV and AM (Table 2-7), showing a possible effect of this protein on stallion semen cryotolerance. Significant ( $p < 0.05$ ) regression and correlations coefficients between CRISP-3 and VSL (0.28 and 0.18 respectively), ALH (-0.01 and -0.20 respectively) and AM (-0.30 and -0.23 respectively) were found. The motion parameters such as VSL and BCF contribute to the overall sperm motility and have been reported significantly higher for the ejaculates classified as freezable compared with the nonfreezable ejaculates; while an increase of ALH of the spermatozoa indicates large amplitude of lateral head displacement, and could signifies the hyperactivation of the spermatozoa (Perumal *et al.* 2014). Additionally, a beneficial effect of CRISP-3 on spermatid morphology was found, because the presence of large numbers of morphologically abnormal or damaged sperm in a sample may adversely affect the remaining viable sperm due to an increased oxidative stress (Ball, 2008) and influence the success of pregnancy (Love *et al.* 2000).

**Table 2-7.** Post-thaw semen assessment by levels of CRISP-3 protein

	LEVEL	TM	PM	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF	SV	AM	MI
<b>CRISP3</b>	High	51.2 <sup>a</sup>	31.2 <sup>a</sup>	74.7 <sup>a</sup>	45.7 <sup>a</sup>	57.3 <sup>a</sup>	2.80 <sup>a</sup>	9.3 <sup>a</sup>	47.4 <sup>a</sup>	22.5 <sup>a</sup>	39.9 <sup>a</sup>
	Medium	40.4 <sup>c</sup>	22.2 <sup>c</sup>	72.5 <sup>a</sup>	36.5 <sup>c</sup>	52.8 <sup>b</sup>	2.80 <sup>a</sup>	8.9 <sup>b</sup>	42.9 <sup>b</sup>	29.9 <sup>b</sup>	35.0 <sup>b</sup>
	Low	47.3 <sup>b</sup>	27.9 <sup>b</sup>	73.2 <sup>a</sup>	39.2 <sup>b</sup>	54.5 <sup>ab</sup>	2.67 <sup>b</sup>	8.2 <sup>c</sup>	41.3 <sup>c</sup>	33.7 <sup>c</sup>	38.9 <sup>a</sup>

Different letters within columns indicate statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). TM: total motility. PM: progressive motility. VCL: curvilinear velocity. VSL: straight line velocity. VAP: average path velocity. ALH: amplitude of lateral head displacement. BCF: beat cross frequency. SV: sperm vitality. AM: abnormal morphology. MI: functional integrity of the cell membrane.

Equine CRISP-3 protein seems to be bound to the sperm head in large amounts, and it was suggested (Magdaleno *et al.* 1997) that plays a role in sperm maturation or gamete

interaction, similar to what was suggested and later confirmed for CRISP-1 in mice, rats, and humans (Cohen *et al.* 2000a,b, 2001). Human and equine CRISP-3 are reported to share a 66% amino acid sequence identity (Doty *et al.* 2011) and it may be that CRISP-3 has overlapping functions with CRISP-1 in the process of reproduction (Udby *et al.* 2005). Roberts *et al.* (2003) reported that CRISP-1 acts as an inhibitor of capacitation and thus prevents premature activation of spermatozoa, as studied in rats. CRISP-3 protein in stallion seminal plasma, has been positively associated with first cycle conception rate (Novak *et al.* 2010) and with stallions with high semen freezability (Jobim *et al.* 2011). Additionally, Doty *et al.* (2011) reported that CRISP-3 suppressed polymorphonuclear neutrophils/sperm binding in a dose-dependent manner, which is of importance during sperm transport to the oviduct.

## 2.4 Conclusions

In conclusion, the current study demonstrated positive relationships between CRISP-3 genotype and seminal plasma protein and post-thawing semen quality in stallions, which could serve as biomarker to early identification and selection of stallion with high semen freezability.

## 2.5 Acknowledgements

The authors would like to thank Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, Colombia, for its financial support.

## 2.6 References

1. Ball B.A.(2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science* 107,257–267

2. Brito L., Greene L., Kelleman A., Knobbe M. & Turner R.(2011) Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology* 76(4),745-750.
3. Burke D.F., Worth C.L., Priego E.M., Cheng T., Smink L.J., Todd J.A. & Blundell T.M.(2007). Genome bioinformatic analysis of nonsynonymous SNPs. *BMC Bioinformatics* 8,301
4. Cohen D.J., Ellerman D.A. & Cuasnicu P.S.(2000a). Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biology of Reproduction* 63,462–468.
5. Cohen D.J., Rochwerger L., Ellerman D.A., Morgenfeld M.M., Busso D. & Cuasnicu P.S.(2000b). Relationship between the association of rat epididymal protein “DE” with spermatozoa and the behavior and function of the protein. *Molecular Reproduction and Development* 56,180–188.
6. Cohen D.J., Ellerman D.A., Busso D., Morgenfeld M.M., Piazza A.D., Hayashi M., Young E.T., Kasahara M. & Cuasnicu P.S.(2001) Evidence that human epididymal protein Arp plays a role in gamete fusion through complementary sites on the surface of the human egg. *Biology of Reproduction* 65,1000-1005.
7. Connor M.C.(2009). Development of an ELISA to measure CRISP-3 concentration in equine seminal plasma. Thesis presented for the degree of Master of Science. University of Florida.
8. Dacheux J.L., Castella S., Gatti J.L. & Dacheux F. (2005) Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63,319–41.
9. Doty A., Buhi W.C, Benson S., Scoggin K.E, Pozor M., Macpherson M., Mutz M. & Troedsson M.H.T.(2011) Equine CRISP3 Modulates Interaction between Spermatozoa and Polymorphonuclear Neutrophils. *Biology of Reproduction* 85,157–164.
10. Gamboa S., Rodrigues A., Henriques L., Batista C. & Ramalho-Santos J.(2010) Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology* 73(7),950-958.

11. Gibb Z. & Aitken R.J.(2016). The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. *BioMed Research International*. D9380609. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9380609>
12. Giese A., Jude R., Kuiper H., Raudsepp T., Piumi F., Schambony A., Guérin G., Chowdhary B.P., Distl O., Töpfer-Petersen E. & Leeb T.(2002) Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Gene* 299,101–9.
13. Giesecke K., Hamann H., Stock K.F, Klewitz J., Martinsson G., Distl O., & Sieme H.(2011) Evaluation of ACE, SP17, and FSHB as candidates for stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Animal Reproduction Science* 126,200 – 206
14. Hamann H., Jude R., Sieme H., Mertens U., Topfer-Petersen E., Distl O. & Leeb T.(2007) A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Animal Genetics* 38,259 – 264.
15. Hartl D.(2000). A primer of population genetics. Connecticut: Sinauer Associates, P 221.
16. Hunt R., Sauna Z.E., Ambudkar S.V., Gottesman M.M. & Kimchi-Sarfaty C.(2009). Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods in Molecular Biology* 578,23-39.
17. Jobim M.I.M, Treina C., Zirklerb H., Gregoria R.M, Siemec H., & Mattos R.C.(2011) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 76,765–771
18. Liu J., Sun Y., Yang C., Zhang Y., Jiang Q., Huang J., Ju Z., Wang X., , Zhong J. & Wang C.(2016) Functional SNPs of INCENP Affect Semen Quality by Alternative Splicing Mode and Binding Affinity with the Target Bta-miR-378 in Chinese Holstein Bulls. *PLoS ONE* 11(9), e0162730. doi:10.1371/journal.pone.0162730
19. Love C.C., Varner D.D., Thompson J.A.(2000). Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *Journal of Reproduction and Fertility* 56,93-100.



20. Magdaleno L., Gasset M., Varea J., Schambony A.M., Urbanke C., Raida M., Topfer-Petersen E. & Calvete J.J.(1997) Biochemical and conformational characterization of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *FEBS Letters* 420,179–185.
21. Neild D., Chaves G., Flores M., Mora N., Beconi M. & Agüero A.(1999) Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 51(4),721-727.
22. Novak S., Smith T.A., Paradis F., Burwash L., Dyck M.K., Foxcroft G.R. & Dixon W.T(2010) Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology* 74,956–967.
23. Oldenhof H., Gojowsky M., Wang S., Henke S., Yu C., Rohn K., Wolkers W.F. & Sieme H.(2013) Osmotic Stress and Membrane Phase Changes during Freezing of Stallion Sperm: Mode of Action of Cryoprotective Agents. *Biology of Reproduction* 88(3),1-11
24. Ortega-Ferrusola C., García B., Gallardo-Bolaños J., González-Fernández L., Rodríguez-Martínez H., Tapia J. & Peña F.J.(2009) Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 114(4),393-403.
25. Perumal P., Srivastava S.K., Ghosh S.K. & Baruah K.K.(2014). Computer-Assisted Sperm Analysis of Freezable and Nonfreezable Mithun (*Bos frontalis*) Semen. *Journal of Animals*, article ID675031. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/675031>
26. Restrepo G., Ocampo D., Velásquez A. (2013) Assessment of cryopreserved sperm motility from colombian creole stallions by sperm class analyzer. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 16(2), 445-450
27. Roberts K.P., Wamstad J.A., Ensrud K.M. & Hamilton D.W.(2003) Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein CRISP-1. *Biology of Reproduction* 69,572–581.
28. Schambony A., Gentzel M., Wolfes H., Raida M., Neumann U. & Topfer-Petersen E.(1998) Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochimica et Biophysica Acta* 1387,206–216.

29. Schrimpf R., Dierks C., Martinsson G., Sieme H. & Dist O.(2014) Genome-Wide Association Study Identifies Phospholipase C zeta 1 (PLCz1) as a Stallion Fertility Locus in Hanoverian Warmblood Horses. PLoS ONE 9(10), e109675. doi:10.1371/journal.pone.0109675
30. Udby L., Cowland J.B., Johnsen A.H., Sorensen O.E., Borregaard N. & Kjeldsen L.(2002). An ELISA for SGP28/CRISP-3, a cysteine-rich secretory protein in human neutrophils, plasma, and exocrine secretions. Journal of Immunological Methods 263,43–55.
31. Udby L., Bjartell A., Malm J., Egesten A., Lundwall K., Cowland J.B, Borregaard N. & Kjeldsen I.(2005) Characterization and Localization of Cysteine-Rich Secretory Protein 3 (CRISP-3) in the Human Male Reproductive Tract. Journal of Andrology 26 (3),333-342.

### 3. Capítulo 3. Effect of lyophilized seminal plasma components on the quality of fresh and cryopreserved stallion semen

Este capítulo corresponde al objetivo específico: “**Evaluar algunos componentes bioquímicos del plasma seminal de equinos de la raza criollo colombiano y su asociación con la calidad de semen criopreservado**”

Alexandra Usuga<sup>a\*</sup>, Benjamin Rojano<sup>b</sup>, Giovanni Restrepo<sup>c</sup>

<sup>a</sup> College of Veterinary Medicine and Animal Science, CES University, Medellín, Colombia. *E-mail address:* [ausuga@ces.edu.co](mailto:ausuga@ces.edu.co)

<sup>b</sup> College of Sciences, School of Chemistry, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. *E-mail address:* [brojano@unal.edu.co](mailto:brojano@unal.edu.co)

<sup>c</sup> College of Agricultural Sciences, Department of Animal Science, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. *E-mail address:* [grestre0@unal.edu.co](mailto:grestre0@unal.edu.co)

\* *Corresponding autor. College of Veterinary Medicine and Animal Science, CES University, Calle 10 A # 22-04, Medellín, Colombia.*

*Artículo presentado en el formato de la revista Journal of Equine Veterinary Science, a la que fue sometido.*

#### Highlights

- Composition of seminal plasma influence the fresh semen quality of stallion
- High levels of vitamin E and ions in seminal plasma had higher sperm integrity

- Composition of supplemented seminal plasma is determinant in thawed sperm quality
- A high level of vitamin C alters post-thaw semen quality parameters

### **Abstract**

The importance of seminal plasma (SP) components for stallion semen quality and freezability is little known, therefore, this study aimed to evaluate the relationship between some SP components and fresh/cryopreserved stallion semen quality. Semen of 30 stallions was collected, then SP was recovered and lyophilized. Likewise, protein content (TP), vitamins C (CVIT), E (EVIT), A (AVIT), iron (Fe), copper (Cu), magnesium (Mg) and Zinc (Zn) in SP were assessed. Sperm was frozen in an extender supplemented with lyophilized SP. In addition, the following parameters were assessed: total motility (TM), progressive motility (PM), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), abnormal morphology (AM), sperm vitality (SV), and plasma membrane integrity (PMI). Generalized linear models were fitted. Comparisons of means were done with Tukey's test. Correlation and regression analyses were performed. Vitamins and ions were found to be related to fresh semen quality. For post-thaw sperm parameters, medium TP showed higher TM, PM, VSL, VAP, SV, AM and PMI. Negative regression and correlation coefficients between CVIT and all post-thaw semen parameters were found. Low EVIT yielded the lowest PM, VSL and VAP values, while a high level of AVIT yielded the best results for semen parameters, except for ALH, BCF and SV. A high level of Cu yielded higher results for TM, PM, VCL, ALH. Moreover, a negative correlation was found between Zn, SV and PMI. In conclusion, seminal plasma composition influences fresh and post-thaw stallion semen quality.

**Keywords:** seminal plasma, components, stallion, sperm quality, cryopreservation

## **3.1 Introduction**

Oxidative stress has been identified as a major cause of low seminal fertility [1-3]. In addition, the high content of polyunsaturated fatty acids in the plasma membrane of equine sperm causes it to be susceptible to attacks from free radicals during the freezing process [4]. This in turn limits the use of cryopreserved stallion semen for processes such as artificial insemination [5, 6].

Among the components of stallion seminal plasma (SP), some enzymatic and non-enzymatic antioxidants which protect sperm from the injurious effects of reactive oxygen species (ROS) have been identified [7-9]. In recent years, the study of the biochemical profile and its relationship with the antioxidant capacity of SP has been one of the criteria correlated with stallion semen quality [10, 11]. However, since SP has been associated with a deleterious effect on sperm capacitation, it is normally discarded before the cryopreservation process [12, 13].

For stallions, some studies have reported promising results regarding the improvement of post-thaw sperm quality when it is supplemented with small amounts of SP [13, 14, 15]; however, the characterization of its components is still in the preliminary stages and the influence of these elements on semen quality parameters is almost unknown [8]. It has been reported that some SP proteins can enhance sperm penetration into oocytes [16], promote phagocytosis and the binding of dead spermatozoa [17] and they might be used as markers for high semen freezability [18, 19]. Additionally, a positive correlation between SP total protein content and ram semen freezability has been reported [20]. Moreover, ionic environment have a strong influence on sperm function [8]. Thus, abnormal levels of ions like Ca, Na, K, Zn, and Cu in SP have been reported to be correlated with infertility in humans [21]. Zinc was found to be present in high amounts in semen from mammals, and has been found to be critical in spermatogenesis [22]. Copper is an important element for numerous metalloenzymes and metalloproteins that are involved in energy or antioxidant metabolism. However, it has been reported that in its ionic form ( $\text{Cu}^{+2}$ ) and at high levels, this trace element could rapidly become toxic to a variety of cells, including human spermatozoa [21]. Additionally, some vitamins have been described as an important cellular protection system against oxidative damage [23]. It has been reported that the level of vitamin E in the SP of normozoospermic patients is higher than in asthenoteratozoospermic males. However, high levels of vitamin C have proven to be detrimental to sperm quality [24]. Therefore, studying the biochemical profile of SP makes it possible to characterize the components that are positively related to stallion semen cryopreservation and fertility, thus paving the way for improvements in the storage techniques and early identification of fertile and subfertile animals [13]. The aim of this study was to evaluate some components of seminal plasma as well as their relationship with fresh and cryopreserved stallion semen quality.

## 3.2 Materials and Methods

### 3.2.1 Collection of research material

Semen from 30 Colombian Creole horses whose age ranged between 3 and 15 years was collected via the artificial vagina (Missouri, Minitube) method. Samples were collected from them at least once a week, and their fertility was confirmed by their living offspring. The body condition score of the horses ranged from 6 to 7 (in a scale from 1 to 9). Two ejaculates (sperm fraction) per animal were collected for a total of 60 ejaculates. The volume of each ejaculate was evaluated with a graduated cylinder. Spermatozoa concentration was assessed from a drop of fresh semen using a photometer (Spermacue®, Minitube, Tiefenbach, Germany) and sperm motility using a phase contrast microscope Eclipse E200 (Nikon Inc.), thus obtaining an average of five observation fields (400X). Semen was diluted 1:1 with EquiPlus® (Minitube) and transported at 5°C in an Equitainer® (Minitube). Before dilution, semen was centrifuged for 15 minutes at 800 x g (Ultra-8V radius of rotation of 7.5 cm) in order to recover the seminal plasma (at least 10 mL per sample), which was also transported at 5°C. Abnormal morphology (AM), sperm vitality (SV), and plasma membrane integrity (PMI) were evaluated in fresh sperm as described below.

### 3.2.2 Assessment of biochemical components of stallion seminal plasma

Seminal plasma was re-centrifuged for 10 minutes at 3400 x g (Mikro 220R, Hettich, Germany, radius of rotation: 8.5 cm) and stored at -20°C for a minimum of 24 hours before freeze-drying. Seminal plasma lyophilization was carried out using a modified protocol described by Gianaroli et al. [25]. Furthermore, samples were put inside a freeze-drying machine (Labconco Freeze Dry System Freezone Cat. 77520-00) and exposed to a 30 h lyophilization cycle with a condenser temperature of -50°C and a vacuum of  $25 \times 10^{-3}$  mbar. Lyophilized samples of seminal plasma were mixed and then stored at room temperature.

- **Protein concentration**

Quantification of lyophilized seminal plasma proteins was performed through the Bradford method [26]. Binding of the dye to the protein was assessed through spectrophotometry at 595 nm and room temperature for 5 minutes.

Lyophilized seminal plasma samples were diluted in ultrapure water (Type 1 -Thermo Scientific™ Barnstead™ Easypure™ RoDi). A BSA solution was prepared at a concentration of 1 mg/mL and dilutions for building a standard curve were performed.

#### ▪ **Vitamins concentration**

The content of Vitamin C (ascorbic acid), Vitamin E ( $\alpha$  - Tocopherol) and Vitamin A (retinol), was determined through the high performance liquid chromatography (HPLC) method as per the modified protocol reported by Novakova et al. [27], Wagner et al. [28] and Ahmad et al. [29], respectively. Lyophilized SP samples were diluted in ultra-pure water before injection into the chromatograph. A liquid chromatography (Shimadzu LC-20AD), equipped with a SIL-20A auto injector/HT, a communication module CBM-20A and a diode array detector (PDA) were used. The wavelengths used were 245 nm for vitamin C and 295 nm for vitamin E and A. For vitamin C, quantitation was performed on a C-8 column whose dimensions were (5 $\mu$ m) 250\*4.6. As for vitamins E and A, a column LiChrospher RP-18de was used, its dimensions being (5 $\mu$ m) 250\*4.5. The mobile phase used was formic acid 0.1% for vitamin C and methanol/dichloromethane (85:15,% v / v) for vitamins E and A. The flow rate of the mobile phase was 0.8 mL/min 35 ° C and isocratic conditions for all vitamins. As a standard, curves with HPLC-grade ascorbic acid,  $\alpha$ -Tocopherol, and retinol were previously built.

#### ▪ **Ion concentration**

Content of iron (Fe), copper (Cu), magnesium (Mg 2<sup>+</sup>) and Zinc (Zn) was assessed through flame atomic absorption spectroscopy, as per the modified protocol reported by Barrier-Battut et al. [30]. Moreover, lyophilized SP samples were calcined at 450 ° C, and the ashes obtained were rehydrated with 20 mL of ultrapure water; then 2 mL of nitric acid were added. The mixture was heated (while avoiding vigorous boiling) in order to evaporate 50% of the volume. Subsequently, samples were cooled and lanthanum chloride was added in a proportion of 0.1 % to a volume of 25 mL of ultrapure water. Final solutions were assessed by flame atomic absorption spectroscopy.

### 3.2.3 Cryopreservation of stallion semen

Semen cryopreservation was performed using a programmable freezing protocol. Diluted semen was centrifuged for 15 minutes at 280 x g (Mikro 220R, Hettich, Germany, radius of rotation: 8.5 cm) and the supernatant was discarded. The precipitate was then extended for a total sperm concentration of  $100 \times 10^6$  per mL in EquiPlus® supplemented with 5% of egg yolk, 5% of dimethylformamide (Sigma--Aldrich, St. Louis, USA) and 2 mg/mL of lyophilized seminal plasma (as an equivalent to a supplementation with 10% of liquid seminal plasma). Subsequently, semen was kept in refrigeration at 5°C for 30 minutes and then packed in straws of 0.5 ml (V2 Dual MRS1, IMV Technologies). A controlled curve (Crysalys Cryocontroller PTC-9500) was used at a cooling rate of -8°C/min between 5°C and -6 °C. Then another cooling rate of -0.6 °C/min for 43.3 min between -6°C and -32 °C was used. Straws were stored in a liquid nitrogen tank at -196 °C.

### 3.2.4 Post-thaw semen quality evaluation

Seminal motility was assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA) as per the modified protocol reported by Restrepo et al [31]. This consisted of a phase contrast microscope (Nikon E200) and a digital camera (Basler Scout SCA780) adapted to a computer equipped with the SCA® Motility and Concentration (Microptic S.L.) software. A specific setup was established: a coverslip camera of 20mm x 20mm , optics in ph (-), drop of 7 µL, horse species, thermal plate at 37 ° C and a particle size of 20 to 72µm. The parameters analyzed were: total motility (TM), progressive motility (MP), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), amplitude of lateral head displacement (ALH) and beat cross frequency (BCF). Sperm viability (SV) was determined through the method described by Gamboa et al. [32] with the Live/Dead kit (Molecular Probes Inc). To achieve this, 200 µL of semen were suspended in a Hanks Heppes (HH) solution with 1% of bovine serum albumin (BSA) for a concentration of approximately  $20 \times 10^6$  sperm / mL. Then, the mixture was incubated at 37°C for 8 minutes, with 6 mM SYBR14. Subsequently, it was incubated in the same manner, with 0.48 mM propidium iodide. Then, from a sample of 5 µL, a 200 sperm count was performed using the UV-2A filter of a fluorescence microscope with HBO E200 (Nikon Inc.). Abnormal sperm morphology (AM) was assessed via the supravital technique described by Brito et al. [33]. A droplet of semen and a droplet of eosin-nigrosin (Sigma-



Aldrich, St. Louis, USA) were placed on a microscope slide, mixed, smeared and placed on a warming plate at 37 °C. Subsequently, 200 spermatozoa were assessed individually in an Eclipse E200 (Nikon Inc., Tokyo, Japan) phase contrast microscope. The plasma membrane integrity (PMI) of the sperm was evaluated via the hypoosmotic (HOS) test, according to reports from Neild et al. [34]. To achieve this, 100 µL of semen were added to a tube with 500 µL of a hypo-osmotic sucrose solution 5.4% (100 mOsmol / L). This mixture was incubated at 38.5°C for 30 minutes. Then the reaction of 200 spermatozoa was assessed in at least 5 fields of observation using an Eclipse E200 (Nikon Inc., Tokyo, Japan) phase contrast microscope. To calculate this parameter, the percentage of spermatozoa with coiled tail due to sperm abnormalities was considered.

### **3.2.5 Statistical analysis**

A generalized linear model (GLM) was fitted for each seminal quality parameter (dependent variable) and the levels (high, medium and low) of each seminal plasma component were established through a quartiles analysis. Given the use of parametric tests, data normality was assessed with the Shapiro-Wilk test, while comparisons of the means between levels were done with Tukey's test. Moreover, a Pearson correlation analysis between semen quality variables and seminal plasma components was performed. The magnitude of the relationship between variables was evaluated with a regression analysis. The significance level used for all assessments was  $P < 0.05$ . All analyzes were conducted using the SAS version 9.2 software (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

## **3.3 Results and Discussion**

Seminal plasma (SP) is involved in a number of sperm-related functions and events preceding fertilization [12] such as sperm motility activation, antimicrobial action, neutralization of sperm metabolites, protection against acrosin inhibitors by proteases, sperm capacitation mediation and post-coital inflammatory response in the uterus of mares [13, 35].

It has been reported that SP composition varies greatly from stallion to stallion [12]. This is consistent with what this study observed both in the samples and all the components assessed (see Table 1). Some of them, e.g. vitamin concentration, are related to their

consumption or administration [36]. Likewise, the quantity and quality of SP components could vary from individual to individual and may also be affected by some environmental factors such as season of collection, temperature, nutrition and stress [37]. Stallion age has a significant effect on some semen variables as well as on the antioxidant/oxidant status of either blood serum or seminal plasma; for example, it has been reported that seminal plasma zinc, ascorbic acid and nitric oxide concentrations are higher for young stallions [38]. In this study, horse age may be a significant source of variability.

**Table 3-1.** Components of stallion seminal plasma

VARIABLE	MEAN	SD	CV	SE	MIN	MAX
TP (mg BSA/g of SP)	0.35	0.20	57.33	0.01	0.08	0.99
CVIT (mg/g of SP)	2.66	1.11	41.92	0.06	0.65	6.14
EVIT ( $\mu$ g/g of SP)	72.36	52.29	72.27	3.44	6.4	195.8
AVIT ( $\mu$ g/g of SP)	37.37	37.29	99.78	2.15	0	188.9
Cu (mg/Kg of SP)	17.37	8.98	51.73	0.51	4.2	36.8
Fe (mg/Kg of SP)	33.64	27.95	83.08	1.61	3.9	120.8
Zn (mg/kg of SP)	109.08	99.22	90.96	5.72	34.1	558.8
Mg (g/100 g of SP)	0.49	0.45	92.53	0.02	0.01	2.5

SD: standard deviation. CV: coefficient of variation (%). SE: standard error. TP: total protein. CVIT: Vitamin C. EVIT: Vitamin E. AVIT: Vitamin A. Cu: copper. Fe: iron. Zn: zinc. Mg: magnesium

In this study, using lyophilized seminal plasma made it easier to evaluate some of the components that are difficult to detect in liquid plasma, this also favors its storage and preservation conditions. However, most of the studies on equines assessing different components of SP use its liquid form [8, 9, 30], whereas this study performs its various measurements using lyophilized SP. For the samples assessed, it was established that a mean of 0.021 g of lyophilized SP was obtained for each mL of liquid SP. On the other hand, the use of lyophilized seminal plasma allowed for a more precise supplementation based on the contribution of plasma solids (components). Even Whigham [39] found no significant difference between the supplementation with lyophilized SP, fresh and frozen/thawed SP on sperm quality.

The results for quality parameters of fresh semen are described in Table 2. There was a high variability among the samples tested except for SV and PMI (CV<20%). These results are similar to some reported for Colombian Creole horses [40].

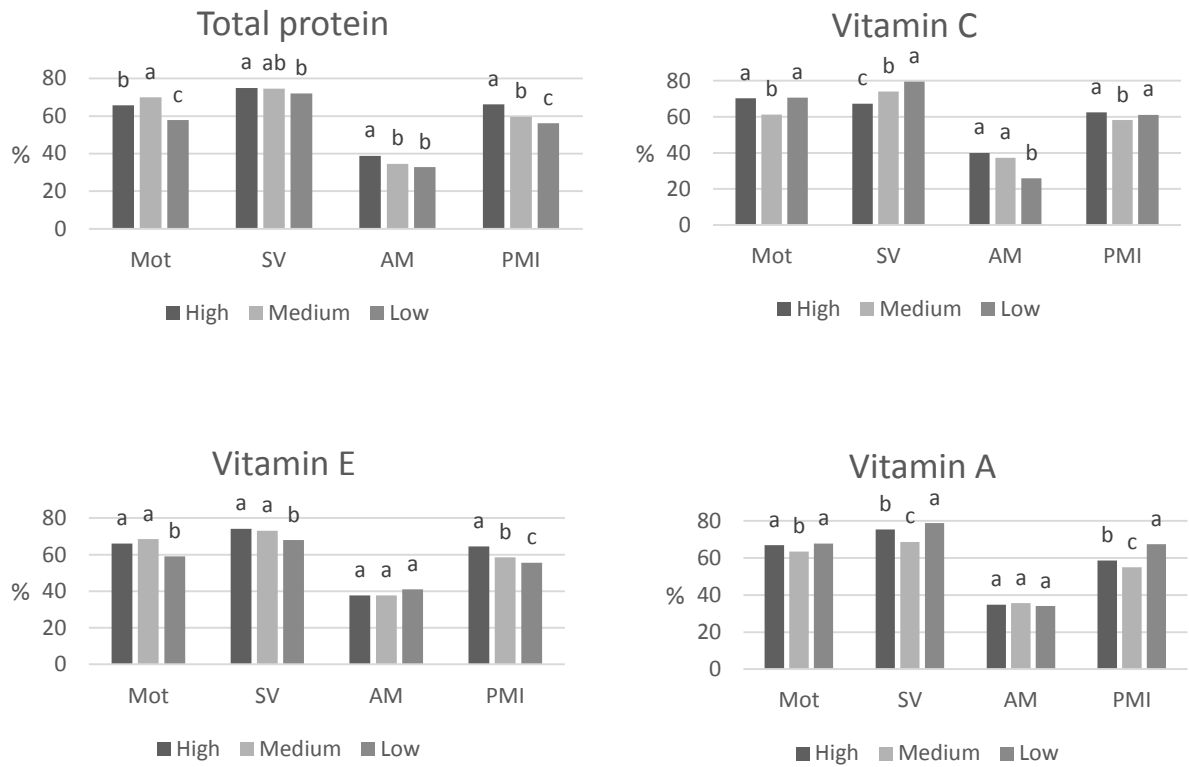
**Table 3-2.** Quality parameters of fresh stallion semen

<b>VARIABLE</b>	<b>n</b>	<b>MEAN</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>	<b>SE</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>
<b>VOLUME (mL)</b>	60	39.95	25.51	63.87	1.47	7.5	110
<b>CONCENTRATION (x 10<sup>6</sup>/mL)</b>	60	183.45	109.57	59.73	6.32	50	549
<b>MOT (%)</b>	60	65.91	15.71	23.84	0.90	60	90
<b>SV (%)</b>	60	73.95	11.49	15.54	0.66	45	95
<b>AM (%)</b>	60	34.93	14.76	42.25	0.85	8	75
<b>PMI (%)</b>	60	59.98	10.22	17.05	0.59	42	89

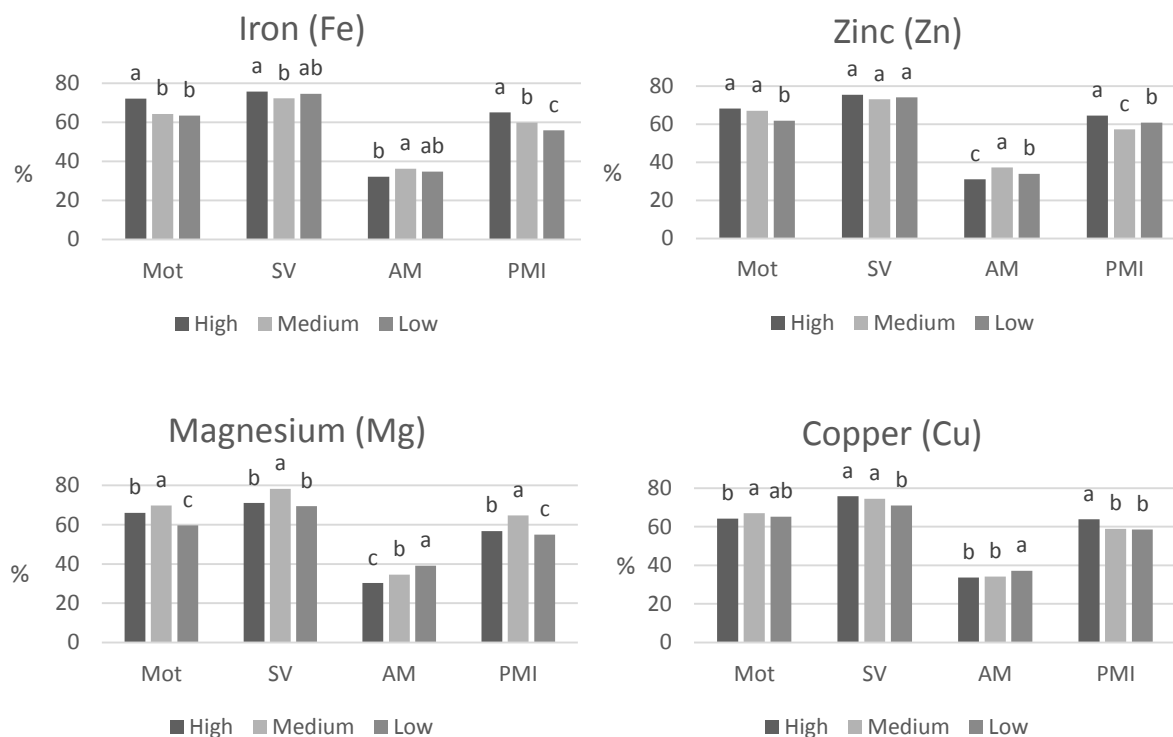
n: number of ejaculates. SD: standard deviation. CV: coefficient of variation (%). SE: standard error. MOT: sperm motility. SV: sperm vitality. AM: abnormal morphology. PMI: plasma membrane integrity.

The effects of the level (high, medium and low) of each of the assessed SP components on fresh semen quality parameters are shown in Figures 1 and 2. A high level of EVIT, Cu, Fe and Zn resulted in higher PIM for fresh semen and better SV for Cu and Fe. This can be explained by the fact that these microelements are part of the antioxidative system present in stallion seminal plasma, which is able to neutralize or remove certain ROS [9]. However, for other SP components such as CVIT, a high level had a deleterious effect on SV and the normal morphology of fresh semen. Likewise, a low level of AVIT showed better results for SV and PMI (see Figure 1). This can be attributed to some antioxidants existing in seminal plasma that can become prooxidants [41] depending on their concentration and the nature of the neighboring molecules [42]. For components such as TP, the results were less consistent because, while a medium level of TP showed higher percentages for MOT, a high level of it had better results for the SV and PMI of fresh semen (see Figure 1). This can be attributed to the fact that SP contains several proteins which have different effects on sperm quality, some being beneficial while others detrimental [43].

**Figure 3-1.** Fresh semen assessment by levels of total protein and vitamins of seminal plasma



Different letters within bars indicate statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). Mot: sperm motility. SV: sperm vitality. AM: abnormal morphology. PMI: plasma membrane integrity.

**Figure 3-2.** Fresh semen assessment by levels of ions of seminal plasma

Different letters within bars indicate statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). Mot: sperm motility. SV: sperm vitality. AM: abnormal morphology. PMI: plasma membrane integrity.

The results for the post-thaw semen quality parameters are shown in Table 3. A decrease in most parameters was observed since, during freezing, sperm is exposed to severe osmotic, thermal and oxidative stress which severely damages the plasma membrane and other spermatid structures [44]. Research has shown that the totality of SP has a detrimental effect on the storage of equine sperm; either cooled or cryopreserved [12]. However, the presence of some SP seems to be necessary for semen storage and fertility [12, 45], since the most important form of antioxidant defense available to spermatozoa is found in seminal plasma [46]. In humans, analysis of SP macro- and microelements has been performed accurately and much is known about the importance of the “right contents” of seminal plasma [8]. In other species, supplementation with freeze-dried seminal plasma for semen cryopreservation has been reported. Almadaly et al. [47] suggested that premature capacitation during freeze-thaw processes of bovine spermatozoa could be reduced by adding desalted and lyophilized SP. Also, the addition of lyophilized equine seminal plasma to the diluent of ram semen has improved post thaw viability parameters, increasing the ability of in vitro fertilization [48].

**Table 3-3.** Post-thawing quality of stallion semen

VARIABLE	N	MEAN	SD	CV	SE	MIN	MAX
TM (%)	300	44.81	15.15	33.81	0.87	14.29	89.81
PM (%)	300	25.88	12.05	46.56	0.69	5.62	68.02
VCL ( $\mu\text{m/S}$ )	300	73.23	16.83	22.98	0.97	14.42	119.1
VSL ( $\mu\text{m/S}$ )	300	39.41	12.82	32.54	0.74	11.03	78.57
VAP ( $\mu\text{m/S}$ )	300	54.31	14.97	27.56	0.86	11.49	100.68
ALH ( $\mu\text{m}$ )	300	2.77	0.61	22.04	0.03	0.51	4.15
BCF (Hz)	300	8.87	1.67	18.81	0.09	1.55	13.15
SV (%)	300	43.55	11.97	27.5	0.69	20	77
AM (%)	300	29.23	10.55	36.1	0.6	9	65
PMI (%)	300	37.21	9.94	26.72	0.57	15	65

n: number of thawed straws. SD: standard deviation. CV: coefficient of variation (%). SE: standard error: TM: total motility. PM: progressive motility. VCL: curvilinear velocity. VSL: straight line velocity. VAP: average path velocity. ALH: amplitude of lateral head displacement. BCF: beat cross frequency. SV: sperm vitality. AM: abnormal morphology. PMI: plasma membrane integrity.

The level (concentration) of each component of seminal plasma used for semen supplementation before freezing had a strong effect on seminal post-thawing quality. For TP, it was observed that a medium level gave the best results for post-thaw TM, PM, VSL, VAP, SV, AM and PMI (see Table 4). This is similar to the results reported by Usuga et al. [49], probably because a high level of TP could lead to greater protein oxidation, and the consequent decrease in semen quality. As mentioned above for fresh semen, TP involves a large number of proteins with different effects. In stallions, proteins such as CRISP3 and HSP2 have been positively related to fertility and high freezability semen, while proteins such as kallikrein, lactoferrin, clusterin and HSP1 have been negatively related [19, 50]. On the other hand, a study on bull semen revealed that the acidic proteins (13–16 kd) of SP could be used as a marker for high semen freezability, and a 25–26-kd SP protein could be a marker of low semen freezability [43]. This could explain the results of the regression and correlation analysis for TP (see Table 5), in which a negative relationship was observed in some post-thawing parameters such as TM, PM and PMI and a positive relationship with VSL, VAP, ALH, SV and AM.

**Table 3-4.** Post-thawing seminal quality by component concentration in seminal plasma

	LEVEL	TM	PM	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF	SV	AM	PMI
<b>TP</b>	High	37.5 <sup>b</sup>	19.8 <sup>c</sup>	68.8 <sup>b</sup>	36.2 <sup>b</sup>	49.0 <sup>c</sup>	2.79 <sup>a</sup>	9.3 <sup>a</sup>	43.2 <sup>b</sup>	31.8 <sup>a</sup>	34.2 <sup>b</sup>
	Medium	50.1 <sup>a</sup>	30.1 <sup>a</sup>	74.9 <sup>a</sup>	41.5 <sup>a</sup>	56.7 <sup>a</sup>	2.77 <sup>a</sup>	8.6 <sup>b</sup>	46.4 <sup>a</sup>	27.1 <sup>b</sup>	39.5 <sup>a</sup>
	Low	39.4 <sup>b</sup>	21.8 <sup>b</sup>	73.0 <sup>a</sup>	37.6 <sup>b</sup>	53.4 <sup>b</sup>	2.75 <sup>a</sup>	8.9 <sup>ab</sup>	38.0 <sup>c</sup>	31.4 <sup>a</sup>	34.8 <sup>b</sup>
<b>CVIT</b>	High	40.7 <sup>b</sup>	24.4 <sup>b</sup>	64.1 <sup>c</sup>	40.2 <sup>b</sup>	50.7 <sup>b</sup>	2.26 <sup>b</sup>	8.0 <sup>b</sup>	40.3 <sup>c</sup>	32.9 <sup>a</sup>	34.1 <sup>c</sup>
	Medium	42.5 <sup>b</sup>	23.2 <sup>b</sup>	74.2 <sup>b</sup>	36.8 <sup>c</sup>	52.9 <sup>b</sup>	2.91 <sup>a</sup>	9.0 <sup>a</sup>	43.4 <sup>b</sup>	31.3 <sup>b</sup>	36.8 <sup>b</sup>
	Low	52.5 <sup>a</sup>	32.0 <sup>a</sup>	79.2 <sup>a</sup>	43.4 <sup>a</sup>	60.0 <sup>a</sup>	2.95 <sup>a</sup>	9.2 <sup>a</sup>	46.6 <sup>a</sup>	22.0 <sup>c</sup>	40.5 <sup>a</sup>
<b>EVIT</b>	High	42.8 <sup>ab</sup>	25.1 <sup>a</sup>	74.6 <sup>a</sup>	36.9 <sup>a</sup>	54.8 <sup>a</sup>	2.6 <sup>a</sup>	8.65 <sup>a</sup>	41.1 <sup>b</sup>	28.8 <sup>b</sup>	36.3 <sup>a</sup>
	Medium	43.7 <sup>a</sup>	26.6 <sup>a</sup>	70.9 <sup>b</sup>	41.6 <sup>a</sup>	54.3 <sup>a</sup>	2.5 <sup>b</sup>	8.67 <sup>a</sup>	45.4 <sup>a</sup>	29.5 <sup>b</sup>	37.7 <sup>a</sup>
	Low	41.1 <sup>b</sup>	19.8 <sup>b</sup>	68.0 <sup>b</sup>	34.9 <sup>b</sup>	49.8 <sup>b</sup>	2.7 <sup>a</sup>	8.60 <sup>a</sup>	40.3 <sup>b</sup>	36.6 <sup>a</sup>	36.2 <sup>a</sup>
<b>AVIT</b>	High	48.8 <sup>a</sup>	30.5 <sup>a</sup>	80.8 <sup>a</sup>	43.8 <sup>a</sup>	62.3 <sup>a</sup>	2.7 <sup>b</sup>	8.8 <sup>b</sup>	44.5 <sup>a</sup>	23.8 <sup>c</sup>	38.3 <sup>a</sup>
	Medium	42.3 <sup>b</sup>	25.2 <sup>b</sup>	68.9 <sup>b</sup>	41.1 <sup>b</sup>	53.5 <sup>b</sup>	2.4 <sup>c</sup>	8.4 <sup>c</sup>	42.0 <sup>b</sup>	33.2 <sup>a</sup>	36.6 <sup>b</sup>
	Low	43.3 <sup>b</sup>	21.4 <sup>c</sup>	69.9 <sup>b</sup>	32.4 <sup>c</sup>	46.3 <sup>c</sup>	3.1 <sup>a</sup>	9.4 <sup>a</sup>	44.3 <sup>a</sup>	30.3 <sup>b</sup>	36.5 <sup>b</sup>
<b>CU</b>	High	51.1 <sup>a</sup>	29.6 <sup>a</sup>	79.0 <sup>a</sup>	38.9 <sup>b</sup>	57.5 <sup>a</sup>	3.0 <sup>a</sup>	8.9 <sup>a</sup>	45.2 <sup>a</sup>	25.7 <sup>c</sup>	39.4 <sup>a</sup>
	Medium	45.2 <sup>b</sup>	25.6 <sup>b</sup>	70.2 <sup>c</sup>	38.6 <sup>b</sup>	52.3 <sup>b</sup>	2.7 <sup>b</sup>	8.7 <sup>a</sup>	44.5 <sup>a</sup>	28.9 <sup>b</sup>	38.8 <sup>a</sup>
	Low	38.4 <sup>c</sup>	22.9 <sup>c</sup>	73.7 <sup>b</sup>	41.3 <sup>a</sup>	55.2 <sup>a</sup>	2.6 <sup>b</sup>	8.9 <sup>a</sup>	40.2 <sup>b</sup>	32.7 <sup>a</sup>	32.2 <sup>b</sup>
<b>FE</b>	High	48.0 <sup>a</sup>	27.8 <sup>a</sup>	72.1 <sup>b</sup>	38.8 <sup>b</sup>	52.9 <sup>b</sup>	2.85 <sup>a</sup>	9.2 <sup>a</sup>	42.3 <sup>b</sup>	24.6 <sup>c</sup>	37.0 <sup>ab</sup>
	Medium	43.4 <sup>b</sup>	25.7 <sup>b</sup>	77.9 <sup>a</sup>	42.0 <sup>a</sup>	58.2 <sup>a</sup>	2.84 <sup>a</sup>	8.9 <sup>a</sup>	43.1 <sup>b</sup>	28.9 <sup>b</sup>	36.6 <sup>b</sup>
	Low	44.4 <sup>b</sup>	24.4 <sup>b</sup>	65.4 <sup>c</sup>	35.0 <sup>c</sup>	48.2 <sup>c</sup>	2.57 <sup>b</sup>	8.3 <sup>b</sup>	45.3 <sup>a</sup>	33.8 <sup>a</sup>	38.4 <sup>a</sup>
<b>ZN</b>	High	45.4 <sup>b</sup>	24.5 <sup>b</sup>	67.8 <sup>b</sup>	34.7 <sup>b</sup>	47.9 <sup>c</sup>	2.7 <sup>b</sup>	8.1 <sup>b</sup>	40.8 <sup>b</sup>	31.8 <sup>a</sup>	37.3 <sup>ab</sup>
	Medium	41.9 <sup>c</sup>	24.1 <sup>b</sup>	70.8 <sup>b</sup>	40.8 <sup>a</sup>	53.9 <sup>b</sup>	2.6 <sup>b</sup>	9.2 <sup>a</sup>	44.4 <sup>a</sup>	28.2 <sup>b</sup>	36.5 <sup>b</sup>
	Low	49.5 <sup>a</sup>	30.3 <sup>a</sup>	82.4 <sup>a</sup>	40.7 <sup>a</sup>	60.6 <sup>a</sup>	2.9 <sup>a</sup>	8.8 <sup>a</sup>	44.1 <sup>a</sup>	28.7 <sup>b</sup>	38.2 <sup>a</sup>
<b>MG</b>	High	42.4 <sup>b</sup>	25.6 <sup>b</sup>	78.2 <sup>a</sup>	42.1 <sup>a</sup>	58.0 <sup>a</sup>	2.7 <sup>a</sup>	8.88 <sup>a</sup>	41.3 <sup>b</sup>	25.4 <sup>c</sup>	32.4 <sup>c</sup>
	Medium	50.8 <sup>a</sup>	30.2 <sup>a</sup>	75.1 <sup>b</sup>	39.6 <sup>b</sup>	54.5 <sup>b</sup>	2.8 <sup>a</sup>	8.89 <sup>a</sup>	46.4 <sup>a</sup>	28.3 <sup>b</sup>	41.3 <sup>a</sup>
	Low	37.1 <sup>c</sup>	19.2 <sup>c</sup>	66.4 <sup>c</sup>	36.8 <sup>c</sup>	51.0 <sup>c</sup>	2.5 <sup>b</sup>	8.83 <sup>a</sup>	40.8 <sup>b</sup>	33.5 <sup>a</sup>	34.5 <sup>b</sup>

Different letters within columns indicate statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). TM: total motility. PM: progressive motility. VCL: curvilinear velocity. VSL: straight line velocity. VAP: average path velocity. ALH: amplitude of lateral head displacement. BCF: beat cross frequency. SV: sperm vitality. AM: abnormal morphology. PMI: plasma membrane integrity. TP: total protein (mg BSA/g of SP). CVIT: Vitamin C (mg/g of SP). EVIT: Vitamin E ( $\mu\text{g/g}$  of SP). AVIT: Vitamin A ( $\mu\text{g/g}$  of SP). Cu: copper (mg/kg of SP). Fe: iron (mg/kg of SP). Zn: zinc (mg/kg of SP). Mg: magnesium (g/100 g of SP). Component levels: TP (low  $< 0.2$ , medium  $0.2 - 0.4$ , high  $> 0.4$ ); CVIT (low  $< 1.9$ , medium  $1.9 - 3.4$ , high  $> 3.4$ ); EVIT (low  $< 25.1$ , medium  $25.1 - 95.9$ , high  $> 95.9$ ); AVIT (low  $< 5.8$ , medium  $5.8 - 47.1$ , high  $> 47.1$ ); CU (low  $< 10.9$ , medium  $10.9 - 22.2$ , high  $>$

22.2); FE (low < 14.0, medium 14.0 - 45.9, high > 45.9); ZN (low < 52.6, medium 52.6 - 116.7, high > 116.7); MG (low < 0.2, medium 0.2 - 0.7, high > 0.7).

For CVIT, it was found that a low level had the highest results for all post-thaw semen quality parameters except for ALH and BCF (see Table 4). Likewise, we found negative regression and correlation coefficients for all parameters (see Table 5), thus demonstrating a clear negative effect of this component on post thawing semen quality. These results are similar to those reported by Waheed et al [9] and Usuga et al [49], who obtained lower concentrations of vitamin C in horses with high fertility and better post-thaw semen quality, respectively. In addition, it has been observed that supplementing with high concentrations of ascorbic acid for stallion semen cryopreservation has negative effects on lipid peroxidation of the plasmatic membrane [51]. This is due to the fact that, in presence of transition metals, vitamin C makes radicals highly reactive and more destructive, thus generating more free radicals. In addition, it has the ability to promote the release of these transition metals from proteins, which contributes to this effect [49, 51].

Based on the correlation and regression coefficients found (see Table 5), the relationship between EVIT and TM, PM, ALH, BCF and SV was positive. In contrast, it was negative between EVIT and AM. This is backed by the results shown in Table 4, in which a low level of EVIT resulted in the lowest results for PM, VSL, VAP and normal morphology. Moreover, a high level of AVIT produced the best results for the semen quality parameters, except for ALH, BCF and SV (see Table 4); these results are consistent with the positive relationship found between vitamin A and most of the post-thaw parameters (see Table 5). DL- $\alpha$ -tocopherol (Vitamin E) is an important cellular system of protection against oxidative damage and a lipophilic component that not only scavenges oxygen radicals from within the membrane but also intercepts lipid peroxy radicals which appear to be important in the propagation of the chain reaction of lipid peroxidation [23, 41]. Although studies have examined the addition of Vitamin E to semen to improve sperm preservation, there have not been consistent improvements in the maintenance of sperm motility or fertility [23]. However, Vasconcelos et al. [51] found that  $\alpha$ -tocopherol supplementation improved membrane lipid peroxidation and had a positive effect on post-thaw membrane integrity and plasma membrane stability of stallion semen. No studies conducted with equines assessing the concentration of  $\alpha$ -tocopherol in SP and its effect on semen quality were found; therefore, this study can be considered as the first report. In humans, it has been reported that the level of vitamin E in SP of normozoospermic patients was higher than in asthenoteratozoospermic males [24]. Similarly, there are no reports for retinol (vitamin A) assessments in equine seminal



plasma. In bulls, the percentage of sperm cells with altered acrosome was reduced when there was retinol in the extender under heat stress conditions [52]. For other species, a positive correlation between retinol content in SP and sperm motility, membrane integrity and normal morphology has been found [53, 54]. These results are similar to those found in this study for vitamin A (see Tables 4 and 5), for which a ROS scavenger activity has been reported [52]; this effect perhaps became evident in the post-thawing results, due to the oxidative stress increase that occurs during the cryopreservation process [55].

**Table 3-5.** Regression (top line) and correlations (*lower line*) coefficients between seminal plasma components and stallion cryopreserved semen quality parameters

	TM	PM	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF	SV	AM	PMI
<b>TP</b>	-4.56	2.36	15.44*	11.52*	13.54*	0.17	0.97	-0.06	-3.18	-9.98*
	-0.24*	-0.20*	-0.16*	-0.08	-0.13	0.15*	-0.02	0.12*	0.20*	-0.20*
<b>CVIT</b>	-3.64*	-2.69*	-7.79*	-3.50*	-5.19*	-0.29*	-0.71*	-3.44*	3.87*	-0.55*
	-0.30*	-0.25*	-0.46*	-0.22*	-0.33*	-0.55*	-0.42*	-0.30*	0.43*	-0.17*
<b>EVIT</b>	0.03	0.03*	0.03	-0.001	0.009	0.001	0.004*	0.04*	-0.04*	0.01
	0.14*	0.11*	0.09	0.007	0.008	0.20*	0.24*	0.09	-0.23*	-0.01
<b>AVIT</b>	0.04	0.10*	0.14*	0.16*	0.19*	-0.003*	-0.002	-0.01	-0.07*	-0.01
	0.18*	0.37*	0.32*	0.49*	0.50*	-0.18*	-0.11	0.07	-0.27*	0.07
<b>CU</b>	0.31*	0.14	0.18	-0.17*	0.01	0.01*	-0.01	0.15	-0.19*	0.23*
	0.25*	0.15*	0.19*	-0.08	0.05	0.38*	0.07	0.09	-0.22*	0.19*
<b>FE</b>	-0.06*	-0.04	-0.07*	0.004	-0.03	-0.001	0.009*	-0.11*	-0.04*	-0.07*
	-0.06	-0.08	-0.07	-0.04	-0.09	0.08	0.17*	-0.21*	-0.15*	-0.16*
<b>ZN</b>	-0.015	-0.009	0.006	-0.002	-0.005	0.008*	0.001	-0.02*	-0.02*	-0.01*
	-0.08	-0.11	-0.006	-0.06	-0.10	0.18*	0.11*	-0.15*	-0.22*	-0.16*
<b>MG</b>	4.53*	5.20*	8.19*	7.13*	7.15*	0.06	-0.03	3.95*	-3.63*	-1.51
	0.05	0.13*	0.10	0.21*	0.13*	-0.06	-0.07	-0.006	-0.16*	-0.12*

\*Coefficient with  $p < 0.05$ . TM: total motility. PM: progressive motility. VCL: curvilinear velocity. VSL: straight line velocity. VAP: average path velocity. ALH: amplitude of lateral head displacement. BCF: beat cross frequency. SV: sperm vitality. AM: abnormal morphology. PMI: plasma membrane integrity. TP: total protein (mg BSA/g of SP). CVIT: Vitamin C (mg/g of SP). EVIT: Vitamin E ( $\mu\text{g/g}$  of SP). AVIT: Vitamin A ( $\mu\text{g/g}$  of SP). Cu: copper (mg/kg of SP). Fe: iron (mg/kg of SP). Zn: zinc (mg/kg of SP). Mg: magnesium (g/100 g of SP)

Sperm function is highly dependent on ionic environment [37]. The results of post-thaw semen assessment by ion level are shown in table 4. A high level of Cu produced higher results for TM, PM, VCL, ALH and a decrease of AM. Conversely, a low level of it produced the lowest results for TM, PM, SV and PMI. These findings are backed by the regression and correlation coefficients between Cu and the post-thaw semen quality parameters (see Table 5). Copper is necessary for many enzymes such as superoxide-

dismutase (SOD), which is involved in cell protection against ROS [8]. This could explain its favorable effect on post-thawing seminal quality. Likewise some researchers have observed a positive correlation between SP Cu content and sperm motility in buffalo [56]. This study also found a positive correlation between post-thaw seminal quality parameters such as TM, PM, VCL, VSL, VAP, SV, and Mg (see Table 5), as well as a negative correlation with AM. Similarly, low levels of Mg showed the lowest results for TM, TP, VCL, VSL and VAP (see Table 4). This effect could be explained because Mg is found in nearly all enzymatic systems, is regarded as a marker of seminal vesicle secretions [37] and could play an important role in sperm motility [42]. Furthermore, a positive correlation has been observed between Mg and apoptosis-free viable cells in rams [57].

The low values for TM, PM, VCL, VAP, ALH and PMI due to a low level of Zn in the supplemented seminal plasma (see Table 4), as well as the negative correlation found between Zn and some post-thawing parameters (see Table 5), could be attributed to the fact that Zn can affect the motility control by restraining energy utilization through adenosine triphosphate systems and through regulation of phospholipid energy reserves [37], which may in turn affect semen quality. Despite these effects, studies have shown contradictory results. In human semen samples, high zinc concentrations were associated with a decrease in progressive motility [58] and its concentration in the seminal plasma from infertile men has been reported to be significantly higher than in normal men [59].

The results obtained for Fe are less consistent, as negative correlations with TM, VLC, SV, AM and PMI were found (see Table 5). Similarly, it was observed that low levels of Fe yielded the best results for SV and PMI, while the best results for TM and PM were obtained with high levels of it (see Table 4). Although there are few reports assessing this ion in seminal plasma from stallions [8], it has been studied extensively in humans, with contradictory results. It has been reported that in oligoasthenozoospermia and asthenozoospermia the mean concentration of iron was lower; on the contrary, higher concentration of iron was likely to be responsible for reduced sperm motility [60] and correlated with teratozoospermic males [61]. Iron is known to be essential and mostly bound to transferrin (produced by Sertoli cells), haptoglobin (Sertoli, Leydig and germ cells) and lactoferrin (spermatozoa, vesicular gland). These proteins contain catalytic inactive iron to avoid extensive oxidation [8].

### 3.4 Conclusions

The quality of fresh stallion semen is highly dependent on the composition of seminal plasma. This is also true for frozen/thawed semen when it has been supplemented as freeze-dried seminal plasma.

### 3.5 Acknowledgments

The authors would like to thank Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid for its financial support and the Food Science Laboratory of Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín for its technical support.

### 3.6 References

- [1] Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl* 2006; 9: 69–75.
- [2] Moein MR, Dehghani VO, Tabibnejad N, Vahidi S. Reactive oxygen species (ROS) level in seminal plasma of infertile men and healthy donors. *Iran J Reprod Med* 2007; 5:51-5.
- [3] Ball BA. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci* 2008; 107 (3-4): 257–267.
- [4] García BM, Fernández LG, Ferrusola CO, Salazar-Sandoval C, Rodríguez AM, Martínez HR, et al. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reprod Domest Anim* 2011; 46(1):141-8.
- [5] Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61:481-92.
- [6] Ortega FC, González FL, Morrell JM, Salazar SC, Macías GB, Rodríguez-Martínez H, et al. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction* 2009; 138(1):55- 63.
- [7] Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology* 2005; 63(5):1354-1365.

- [8] Pesch S, Bergmann M, Bostedt H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology* 2006; 66: 307–313
- [9] Waheed M, El-Bahr SM, Al-haider AK. Influence of Seminal Plasma Antioxidants and Osteopontin on Fertility of the Arabian Horse. *J Equine Vet Sci* 2013; 33: 705-709
- [10] Wnuk M, Lewinska A, Oklejewicz B, Bartosz G, Tischner M, Bugno-Poniewierska M. Redox status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude of DNA damage in sperm cells. *Theriogenology*. 2010; 74: 1677–1684
- [11] Restrepo G, Zapata K, Rojano B. Evaluación de la capacidad antioxidante total del plasma seminal equino. *Zootecnia Trop*. 2015; 31 (1): 79-87.
- [12] Kareskoski M, Katila T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim Reprod Sci*. 2008; 107:249-56.
- [13] Guasti PN, Monteiro GA, Papa FO. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. *Vet Zootec* 2012; 19(2): 169-180
- [14] Alghamdi AS, Troedsson MH, Xue JL, Crabo BG. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on post-thaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *Am J Vet Res* 2002; 63:880-5.
- [15] Pizarro LE, Restrepo BG, Echeverry ZJ, Rojano B. Efecto del plasma seminal sobre el estado redox del semen equino criopreservado. *Rev MVZ Córdoba* 2013; 18 (Supl):3672-3680.
- [16] El-Hajj Ghaoui R, Gillan L, Thomson PC, Evans G, Maxwell WMC. Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status, and in vitro fertility of ram spermatozoa. *J Androl*. 2007; 28: 109–122.
- [17] Dacheux J, Gatti JL, Dacheux F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech*. 2003;61: 7–17.
- [18] Jobim MIM, Gregory RM, Mattos RC. Marcadores protéicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. *Rev Bras Reprod Anim Supl*. 2009; 6: 11-19.
- [19] Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR, et al. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology*. 2010; 74: 956–967.

- [20] Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod.* 2000; 63:1531–1537.
- [21] Hamad AWR, Al-Daghistani HI, Shquirat WD, Abdel-Dayem M, Al-Swaif M. Sodium, Potassium, Calcium and Copper Levels in Seminal Plasma are Associated with Sperm Quality in Fertile and Infertile Men. *Biochem Pharmacol.* 2014; 3(4): 141
- [22] Shquirat WD, Daghistani HIA, Hamad AWR, Dayem MA, Swaifi MA. Zinc, Manganese, and Magnesium in seminal fluid and their relationship to male infertility in Jordan. *Int J of Pharm Med Sci.* 3: 1-10.
- [23] Almeida J, Ball BA. Effect of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2005; 87: 321-337.
- [24] Nouri M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, Shahnazi V, Novin MG. Vitamins C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of asthenoteratozoospermic and normozoospermic men. *Iran J Reprod Med.* 2008; 6 (1): 1-5
- [25] Gianaroli L, Magli MC, Stanghellini I, Crippa A, Crivello AM, Pescatori ES, Ferraretti AP. DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2012; 97(5):1067 – 1073.
- [26] Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
- [27] Novakova L, Solich P, Solichova D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Tr Anal Chem* 2008; 27 (10): 942 – 958
- [28] Wagner KH, Wotruba F, Elmadfa I. Antioxidative potential of tocotrienols and tocopherols in coconut fat at different oxidation temperatures. *Eur J Lipid Sci Tech* 2001; 103: 746–751
- [29] Ahmad MK, Mahdi AA, Shukla KK, Islam N, Jaiswar SP, Ahmad S. Effect of *Mucuna pruriens* on semen profile and biochemical parameters in seminal plasma of infertile men. *Fertil Steril* 2008; 90 (3): 627 – 635
- [30] Barrier-Battut I, Delajarraud H, Legrand E, Bruyas JF, Fiéni F, Tainturier D, et al. Calcium, magnesium, copper, and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. *Theriogenology* 2002; 58: 229 – 232.

- [31] Restrepo G, Ocampo D, Velásquez A. Assessment of cryopreserved sperm motility from colombian creole stallions by sperm class analyzer. *Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient.* 2013; 16(2): 445-450
- [32] Gamboa S, Rodrigues A, Henriques L, Batista C, Ramalho-Santos J. Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology* 2010; 73(7):950-958.
- [33] Brito L, Greene L, Kelleman A, Knobbe M, Turner R. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology* 2011; 76(4):745-750
- [34] Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 51(4):721-727.
- [35] Troedsson MHT, Desvovsge AS, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci.* 2005; 89: 171-86.
- [36] Williams C, Carlucci S. Oral vitamin E supplementation on oxidative stress, vitamin and antioxidant status in intensely exercised horses. *Equine Vet J* 2006; 36: 617-621.
- [37] Juyena NS, Stelletta C. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *J Androl.* 2012; 33(4): 536 – 551.
- [38] Gamal A, El S, Amal M, Abo EM, Zaher MR. Comparative blood and seminal plasma oxidant/antioxidant status of Arab stallions with different ages and their relation to semen quality. *Asian Pac J Reprod.* 2016; 5(5): 428–433
- [39] Whigham AL. Effect of seminal plasma on equine sperm quality: preparation and storage techniques. Thesis for the degree of Master of Science. Texas A&M University. 2013.
- [40] Restrepo G, Zapata K, Rojano B. Evaluación de la capacidad antioxidante total del plasma seminal equino. *Zootecnia Trop.* 2015; 31 (1): 79-87.
- [41] Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013; 51, 15-25.
- [42] Villanueva, C., Kross, R.D., 2012. Antioxidant-induced stress. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 2091-2109

- [43] Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*. 2004; 61: 255–266.
- [44] Oldenhof H, Gojowsky M, Wang S, Henke S, Yu C, Rohn K, et al. Osmotic Stress and Membrane Phase Changes During Freezing of Stallion Sperm: Mode of Action of Cryoprotective Agents. *Biol Reprod*. 2013; 88(3): 68, 1–11
- [45] Katila T, Kareskoski M. Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. *Pferdeheilkunde*. 2006; 22 (2): 193-200
- [46] Fazeli F, Salimi S. Correlation of seminal plasma total antioxidant capacity and malondialdehyde levels with sperm parameters in men with idiopathic infertility. *Avicenna J Med Biochem*. 2016; Inpress (Inpress): e29736
- [47] Almadaly E, Hoshino Y, Ueta T, Mukoujima K, Shukry M, Farrag F, El-Kon I, Kita K, Murase T. Desalted and lyophilized bovine seminal plasma delays induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine spermatozoa in response to calcium ionophore. *Theriogenology*. 2015; 83: 175-185
- [48] Casali R, Silva LG, Arcego CC, Zago FC, Avila VS, Mozzaquatro FD, Mezzalira A. Equine lyophilized seminal plasma improves the fertilizing capacity of frozen ovine semen. *Anim. Reprod*. 2014; 11(3): 303
- [49] Usuga A, Restrepo G, Rojano B. Criotolerancia del Semen Equino, Estabilidad Oxidativa y Componentes del Plasma Seminal. *Rev Inv Vet Perú* 2016; 27(3): 505-517.
- [50] Jobim MIM, Treina C, Zirklerb H, Gregorya RM, Siemec H, Mattosa RC. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*. 2011; 76: 765–771.
- [51] Vasconcelos J, Chaveiro A, Góis A, Moreira da Silva F. Effects of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *J Equine Vet Sci*. 2013; 33: 787-793.
- [52] Yousefian I, Zare-Shahneh A, Zhandi M. The effect of coenzyme q10 and  $\alpha$ -tocopherol in skim milk-based extender for preservation of caspian stallion semen in cool condition. *J Equine Vet Sci*. 2014; 34: 949-954.
- [53] Maya-Soriano MJ, Taberner E, Sabés-Alsina M, López-Béjar M. Retinol might stabilize sperm acrosomal membrane in situations of oxidative stress because of high temperatures. *Theriogenology*. 2013; 79: 367–373

- [54] Abdulkareema TA, Al-Habobyb AH, Al-Mjameia SM, Hobia AA. Sperm abnormalities associated with vitamin A deficiency in rams. *Small Ruminant Res.* 2005; 57: 67–71.
- [55] Hussain J, Salam A, Gohar A. A Study on the Cryopreservation of Stallion Semen with Alpha Lipoic Acid. *Inter Res J Pharm.* 2011; 1 (1): 21-26.
- [56] Eghbali M, Alvi-Shoushtari SM, Rezaii SA. Effects of copper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. *Pak J Biol Sci.* 2008; 11: 1964–1968.
- [57] Juyena NS. Protein Profiles and Biochemical Characteristics of Semen: Influence on Frozen-Thawed Spermatozoal Quality in Rams (*Ovis aries*) and Alpacas (*Vicugna pacos*) [PhD thesis]. Padua, Italy: University of Padua; 2011.
- [58] Zhao J, Dong X, Hu K, Long Z, Wang L, Liu Q, et al. Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2016. 6: Article number: 22386.
- [59] Sorensen MB, Bergdahl IA, Hjollund NHI, Bonde JPE, Stoltenberg M, Ernst E. Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. *Mol. Hum. Reprod.* 1999. 5, 331-337
- [60] Akinloye O, Abbiyesuku FM, Oguntibeju OO, Arowojolu AO, Truter EJ. The impact of blood and seminal plasma zinc and copper concentrations on spermogram and hormonal changes in infertile Nigerian men. *Reproductive Biology* 2011; 11: 83–98.
- [61] Skandhan KP, Mazumdar BN, Sumangala B. Study into the iron content of seminal plasma in normal and infertile subjects. *Urología.* 2012; 79(1): 54 – 57.
- [62] Marzec-Wróblewska U, Kamiński P, Lakota P, Szymański M, Wasilow K, Ludwikowski G, et al. Zinc and iron concentration and SOD activity in human semen and seminal plasma. *Biol Trace Elem Res.* 2011; 143(1): 167-77.



## 4. Capítulo 4. Supplementation with lyophilized seminal plasma according to its total antioxidant capacity can improve stallion semen freezability

Este capítulo corresponde al objetivo específico: “**Evaluar el efecto del aporte antioxidante del plasma seminal sobre la calidad post-descongelación del semen de equinos de la raza criollo colombiano**”.

Alexandra Usuga<sup>a\*</sup>, Giovanni Restrepo<sup>b</sup>, Benjamin Rojano<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, CES University, Medellín, Colombia. *E-mail:* [ausuga@ces.edu.co](mailto:ausuga@ces.edu.co)

<sup>b</sup>Faculty of Agricultural Sciences, Department of Animal Science, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. *E-mail address:* [grestre0@unal.edu.co](mailto:grestre0@unal.edu.co)

<sup>c</sup>Faculty of Sciences, School of Chemistry, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. *E-mail:* [brojano@unal.edu.co](mailto:brojano@unal.edu.co)

\* *Corresponding author. School of Veterinary Medicine and Animal Science, CES University, address: Calle 10 A # 22-04, Medellín, Colombia.*

*Artículo presentado en el formato de la revista Theriogenology, a la que fue sometido.*

### Highlights

- Stallion semen supplemented with low and medium ORAC levels of seminal plasma, results in better sperm cryosurvival, which was measured in terms of post-thaw motile spermatozoa with intact membranes.

- Seminal plasma supplementation with high ORAC levels reduces the values of some post-thaw seminal quality parameters.
- Supplementing stallion semen with low and medium ORAC levels of seminal plasma may improve total post-thaw motility as well as the membrane integrity of spermatozoa for poor freezability samples.

## **Abstract**

Oxidative stress has been identified as a major cause of low seminal fertility. The aim of this study was to evaluate the effect of lyophilized seminal plasma (LSP) supplementation, according to different levels of total antioxidant capacity (TAC), on stallion semen freezability. Seminal plasma was obtained from 30 Colombian Creole horses and was lyophilized to acquire a pool of LSP. Fifteen ejaculates from five stallions were collected and supplemented with LSP according to its oxygen radical absorbance capacity (ORAC) level (high, medium, low and control) before freezing. Post-thaw, total (TM) and progressive (PM) motility, kinetics (VCL, VSL and VAP), sperm viability (SV), sperm morphology (SM) and membrane integrity (HOS) were evaluated. For statistical analysis, completely randomized mixed models were fitted. Additionally, semen samples were divided into two groups according to their freezability. Means were compared using Tukey's test. The significance level used was  $p < 0.05$ . Supplementing stallion semen with low and medium ORAC levels of seminal plasma, showed a positive effect on the post-thaw TM and HOS of spermatozoa. In contrast, seminal plasma supplementation with high ORAC level, showed a decrease in post-thaw seminal parameters as TM, PM, VSL and SV. For good freezability samples, in most of post-thaw semen quality parameters, supplementation showed no significant effect, while for poor freezability samples, low and medium ORAC levels of seminal plasma supplementation showed higher results for post-thaw TM and HOS. In conclusion, supplementing stallion semen with LSP before the freezing process, can improve its freezability, according to the TAC contribution.

**Keywords:** sperm, freezing, oxidative stress, equine

## **4.1 Introduction**

Oxidative stress results from an increased generation of reactive oxygen species (ROS) and a decreased available antioxidant defense system [1]. Stallion sperm is particularly sensitive to oxidative stress, due to the high proportion of polyunsaturated fatty acids

present in the membrane, which can be oxidized leading to lipid peroxidation [2]. The most important form of antioxidant defense available to spermatozoa is the antioxidants in seminal plasma [3]. It is known that seminal plasma protects the spermatozoa from the oxidative stress that occurs in the testicles and the epididymis and even on ejaculated spermatozoa in the female genital tract [4], where additionally, leads to activation and expansion of lymphocyte populations that are causally linked with those that later facilitate embryo implantation [5]. Seminal plasma contains many chemical components with antioxidant properties, enzymatic and non-enzymatic [6], which together determine its total antioxidant capacity (TAC) [7]. For this reason, removal of seminal plasma before freezing causes loss of antioxidants present in semen, exposing spermatozoa to excessive ROS damage [8]. In addition, osmotic and thermal stress occur during freezing [9].

Measurement of TAC has proven to be accurate, reliable and as easy to use as a diagnostic tool in the evaluation and follow-up of male fertility [10]. In comparison, the quantification of antioxidants is a complicated, expensive and time-consuming task [5]; besides, assessing TAC of a sample can give more biologically relevant information than those obtained from the measurement of concentrations of individual antioxidants [11]. Low levels of TAC have been associated with infertility and abnormal semen parameters in humans [12, 13]. In rams, the effect of antioxidants supplementation on TAC and post-thaw quality semen parameters has been assessed [14]. However, there are few reports that assess this aspect for the equine species. Wnuk et al. [15] found a negative correlation between TAC of stallion seminal plasma by ABTS<sup>•+</sup> radical cation discoloration (ABTS) assay, and DNA fragmented sperm. On the other hand, Restrepo et al. [16] reported TAC evaluation of equine seminal plasma using oxygen radical scavenging capacity (ORAC) and ferric reducing power (FRAP) assays, finding a significant effect of ORAC on motility and sperm morphology. The aim of this study was to evaluate the effect of lyophilized seminal plasma (LSP) supplementation according to different levels of TAC on stallion semen freezability.

## 4.2 Materials and Methods

### 4.2.1 Sample collection

Semen used in this study was obtained from five Colombian Creole horses (*Equus caballus*), located in Antioquia, Colombia. The age of the animals ranged from 5 to 8 years. Samples were collected from them at least once a week, and their fertility was

confirmed by their living offspring. The body condition score of the horses ranged from 6 to 7 (scale ranges from 1 to 9). They were subjected to the same animal husbandry conditions during stabling and their diet was based on hay composed of star grass (*Cynodon nlemfuensis*) administered at will. Three ejaculates (sperm fraction) per animal, for a total of 15 ejaculates, were collected. For this purpose, a Missouri (Minitube, Tiefenbach, Germany) artificial vagina lubricated with non-spermicidal gel and a mare, were used. The gel fraction of the ejaculate was removed by filtration. The volume of each ejaculate was evaluated with a graduated cylinder. Spermatozoa concentration was assessed from a drop of fresh semen using a photometer (Spermacue®, Minitube, Tiefenbach, Germany). Semen was diluted 1:1 with EquiPlus® (Minitube, Tiefenbach, Germany) and was transported at 5°C in an Equitainer® (Minitube, Tiefenbach, Germany), during a two hour period prior to its freezing.

#### **4.2.2 Seminal plasma freeze-drying**

To obtain a pool of LSP, semen from another 30 stallions with the same characteristics described above, was collected and centrifuged for 15 minutes at 800 x g. A volume of 20 mL of seminal plasma from each ejaculated, was re-centrifuged for 10 minutes at 3400 x g and stored at -20°C for a minimum of 24 hours before freeze-drying. Seminal plasma lyophilization was carried out using a modified protocol described by Gianaroli et al. [17]. Samples were put inside a freeze-drying machine (Labconco Freeze Dry System Freezone Cat. 77520-00, Kansas City, USA) and exposed to a 30 h lyophilization cycle with a condenser temperature of -50°C and vacuum of  $25 \times 10^{-3}$  mbar. Lyophilized samples of seminal plasma were mixed and then stored at room temperature.

#### **4.2.3 Total antioxidant capacity (TAC) of seminal plasma evaluation**

TAC of LSP pool was evaluated by the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay, as reported by Ou et al. [18]. Fluorescein and AAPH (2,2'-azobis 2-amidino-propane) solutions were prepared in PBS at  $1 \times 10^{-5}$  M (75 mM - pH 7.4) and 0.6 M (75 mM, pH 7.4), respectively. Each reaction tube was prepared with 21 µL of fluorescein, 2.899 µL of PBS, 50 µL of AAPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and 30 µg of LSP, that were weighed with an electronic analytical balance (Sartorius M-power, Gottingen, Germany). Controlled conditions of temperature at 37 °C and pH 7.4 were used, additionally Trolox® (Merck, KGaA, Darmstadt, German) was used as a reference

antioxidant. Counts were performed by spectrofluorimetry (LS 55 spectrofluorometer, Perkin Elmer, New York, USA) at a  $\lambda$  excitation of 493 nm and an excitation slit of 5 nm; and a  $\lambda$  emission of 515 nm and an emission slit of 15 nm, with 1% attenuator.

#### 4.2.4 Semen cryopreservation

Semen cryopreservation was performed using a programmable freezing protocol. Each of the 15 ejaculates was centrifuged for 15 minutes at 280 x g, and the supernatant was discarded. The precipitate was extended for a final concentration of  $100 \times 10^6$  sperm per mL, in EquiPlus® supplemented with 5% of egg yolk and 5% of dimethyl formamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The extended semen was divided into four aliquots of which three were supplemented with the required amounts of LPS to achieve three ORAC levels according to the TAC results. The fourth aliquot was used as a control group without supplementation of LSP. The treatments performed are presented in Table 4-1.

**Table 4-1.** Supplementation treatments with lyophilized seminal plasma (LSP) according to total antioxidant capacity (TAC).

Treatment	Control	Low ORAC	Medium ORAC	High ORAC
*LSP (mg / mL)	0	1.44	5.04	8.68
**TAC (ORAC units)	0	4000	14000	24000

\* Amount of supplemented lyophilized seminal plasma. \*\* Total antioxidant capacity (ORAC units) achieved by lyophilized seminal plasma supplementation. An ORAC unit was defined as 1  $\mu$ mol Trolox / 100 g of raw LSP.

Subsequently, semen was maintained in refrigeration at 5 °C during 30 minutes and then packed in straws of 0.5 ml (V2 Dual MRS1, IMV Technologies, Rambouillet, France). A controlled curve (Crysalis Cryocontroller PTC-9500, Biogenics, Inc., Silicon Valley, USA) was used to provide a cooling rate of -8°C/min between 5°C and -6°C, followed by a cooling rate of -6°C/min for 43.3 min down to -32°C. Finally semen was stored in liquid nitrogen at -196 ° C.

### 4.2.5 Semen quality evaluation

Fresh and post-thaw sperm quality was evaluated by the methods described below. Seminal motility and kinetics was assessed using a computer-assisted sperm analysis (CASA), according to a modified protocol reported by Hidalgo et al. [19]. The Sperm Class Analyzer (SCA®, Microptic SL., Barcelona, Spain) Motility and Concentration software was used, and the parameters analyzed were: total motility (TM), progressive motility (PM), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), amplitude of lateral head displacement (ALH), and beat cross frequency (BCF). Particles with a size between 15 and 70  $\mu\text{m}^2$  were evaluated. Normal morphology (NM) was assessed using the modified eosin-nigrosin test [20]. A droplet of semen and a droplet of eosin-nigrosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) were placed on a microscope slide, mixed, smeared and placed on a warming plate at 37 °C. Subsequently, 200 spermatozoa were assessed individually with a microscope (Eclipse E200, Nikon Inc., Tokyo, Japan). Functional integrity of the cell membrane of the spermatozoa was assessed using the hypo-osmotic swelling test (HOS) [21]. To achieve this, 100  $\mu\text{L}$  of semen were added to a tube with 500  $\mu\text{L}$  of a hypo-osmotic sucrose solution 5.4% (100 mOsmol / L). This mixture was incubated at 38.5°C for 30 minutes. Then the reaction of 200 spermatozoa was assessed in at least 5 fields of observation using an Eclipse E200 (Nikon Inc., Tokyo, Japan) phase contrast microscope. Sperm viability (SV) was determined by the method described by Gamboa et al. [22] with the Live/Dead kit (Molecular Probes Inc., Oregon, USA). To achieve this, 200  $\mu\text{L}$  of semen were suspended in Hanks Heppes solution with 1% bovine serum albumin with a concentration of approximately  $20 \times 10^6$  sperm / mL. Then, the mixture was incubated at 37 °C for 8 minutes, with 6 mM SYBR14 (excitation/emission wavelengths of 494/517). Subsequently, it was incubated in the same manner, with 0.48 mM propidium iodide (excitation/emission wavelengths 517/617 nm). Then, from a sample of 5  $\mu\text{L}$ , 200 sperm count was performed with a HBO fluorescence microscope (Eclipse E200, Nikon Inc., Tokyo, Japan), using an excitation filter wavelengths of 510-560 nm.

### 4.2.6 Statistical analysis

Completely randomized mixed models were fitted for each post-thaw quality semen parameter. Each model included the fixed effect for the treatment and the random effect for the ejaculate nested within the stallion. Additionally, for statistical analysis, semen samples were divided into two groups according to their freezability; samples with PM >

35% after freeze–thaw were considered as good freezability, and samples with PM  $\leq$  35% after freeze–thaw were considered as poor freezability [23]. Given the use of parametric tests, data normality was assessed with the Shapiro-Wilk test. Comparisons of the means between treatments and groups were done with Tukey's test. The significance level used for all assessments was  $p < 0.05$ . All analyzes were conducted using SAS version 9.2. Software (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

## 4.3 Results

The ORAC (TAC) found for seminal plasma pool was  $13679.4 \pm 911.6$   $\mu\text{mol Trolox}/100$  g of raw LSP from which treatments were established. For fresh semen, a volume mean of  $29.6 \pm 6.73$  mL and a sperm concentration of  $254.06 \pm 28.44$  spermatozoa  $\times 10^6/\text{mL}$ , were obtained. The results for quality parameters of fresh and post-thaw semen assessment are presented in Table 4-2. For each of the 15 ejaculates, five straws were evaluated per treatment (20 straws per ejaculate) for a total of 300 straws assessed.

All statistical models fitted for the dependent variables were significant ( $p < 0.05$ ), with determination coefficients ( $R^2$ ) above of 0.45. The random effect of the ejaculate nested within the stallion was statistically significant ( $p < 0.05$ ) for all the fitted models, which shows that variability existing in freezability is largely attributable to the stallion and even to the ejaculates from the same animal. The fixed effect of the treatment was significant ( $p < 0.05$ ) for all variables of seminal quality, except for VCL and NM.

**Table 4-2:** Results for semen assessment.

Variable	Fresh semen			Post-thaw semen		
	Mean	SE	CV	Mean	SE	CV
TM (%)	83.78	3.34	15.48	55.14	0.91	28.74
PM (%)	57.15	4.44	30.11	32.18	0.78	42.08
VCL ( $\mu\text{m}/\text{s}$ )	106.41	4.75	17.30	76.9	0.87	19.81
VSL ( $\mu\text{m}/\text{s}$ )	41.96	3.44	31.80	42.39	0.56	22.89
VAP ( $\mu\text{m}/\text{s}$ )	78.46	4.30	21.60	57.45	0.77	23.44
ALH ( $\mu\text{m}$ )	3.34	0.24	27.87	3.03	0.03	17.82
BCF (Hz)	7.65	0.20	10.45	8.91	0.06	12.06
SV (%)	80.93	2.45	11.75	53.57	0.53	17.2
NM (%)	76.60	2.06	34.18	77.22	0.42	32.59
HOS (%)	58.40	3.00	19.91	41.86	0.57	23.59

SE: Standard error. CV: coefficient of variation (%). TM: total motility. PM: progressive motility. VCL: curvilinear velocity. VSL: straight line velocity. VAP: average path velocity. ALH: amplitude of lateral head displacement. BCF: beat cross frequency. SV: sperm vitality. NM: normal morphology. HOS: functional integrity of the cell membrane.

Table 4-3 shows the results of seminal plasma supplementation effect according to different levels of TAC contribution on post-thaw semen quality. Stallion semen supplementation with low and medium ORAC levels had an increase on the post-thaw TM and HOS of spermatozoa, medium and high ORAC levels showed a decrease on VSL and SV, while high ORAC supplementation showed a decrease in post-thaw TM and PM ( $p < 0.05$ ). On the other hand, an increase in ALH by supplementation with a high ORAC level and a reduction in BCF for all ORAC levels were observed.

**Table 4-3:** Post-thaw semen assessment by TAC treatment.

Treatment	TM (%)	PM (%)	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	ALH ( $\mu\text{m}$ )	BCF (Hz)	SV (%)	NM (%)	HOS (%)
Control	54.3 $\pm$ 1.63 <sup>b</sup>	33.9 $\pm$ 1.56 <sup>ab</sup>	78.1 $\pm$ 1.82 <sup>a</sup>	45.0 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>	58.0 $\pm$ 1.81 <sup>ab</sup>	2.9 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	9.6 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	55.1 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>	77.2 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	38.6 $\pm$ 1.09 <sup>b</sup>
Low ORAC	58.9 $\pm$ 1.88 <sup>a</sup>	35.9 $\pm$ 1.57 <sup>a</sup>	77.1 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup>	44.9 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	59.1 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>	2.8 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	8.8 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	55.1 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	77.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	46.5 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>
Medium ORAC	57.9 $\pm$ 1.69 <sup>a</sup>	32.7 $\pm$ 1.44 <sup>b</sup>	77.6 $\pm$ 1.92 <sup>a</sup>	41.8 $\pm$ 1.04 <sup>b</sup>	58.0 $\pm$ 1.53 <sup>ab</sup>	3.1 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	8.5 $\pm$ 0.09 <sup>bc</sup>	51.9 $\pm$ 1.21 <sup>b</sup>	77.5 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>	44.8 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>
High ORAC	49.2 $\pm$ 1.91 <sup>c</sup>	26.0 $\pm$ 1.46 <sup>c</sup>	74.6 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>	37.7 $\pm$ 0.96 <sup>c</sup>	54.6 $\pm$ 1.27 <sup>b</sup>	3.2 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	8.5 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	52.0 $\pm$ 1.10 <sup>b</sup>	76.5 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>	37.2 $\pm$ 1.11 <sup>b</sup>

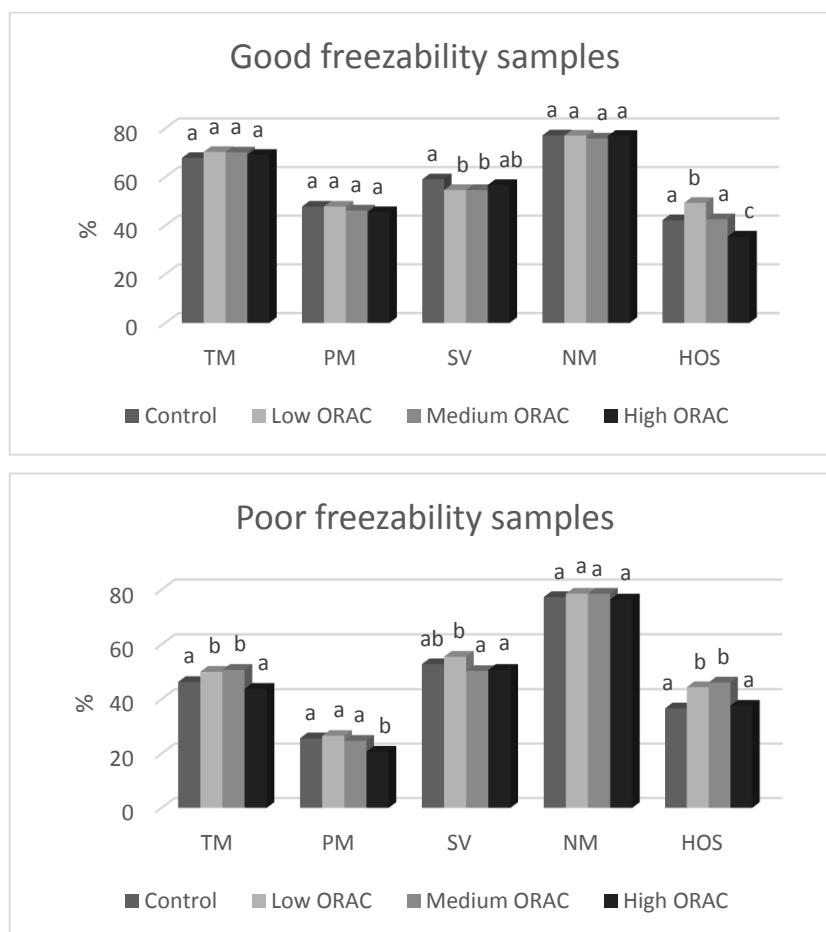
Results are presented as mean  $\pm$  standard error. Different letters within columns indicate statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). An ORAC unit was defined as 1  $\mu\text{mol}$  Trolox / 100 g of raw LSP. High ORAC: 24000 ORAC units. Medium ORAC: 14000 ORAC units. Low ORAC: 4000 ORAC units. TM: total motility. PM: progressive motility. VCL: curvilinear velocity. VSL: straight line velocity. VAP: average path velocity. ALH: amplitude of lateral head displacement. BCF: beat cross frequency. SV: sperm vitality. NM: normal morphology. HOS: functional integrity of the cell membrane.

The results of ORAC supplementation for some post-thaw sperm quality parameters according to freezability of samples are shown in Figure 4-1. From a total of 300 samples evaluated, 35% corresponded to samples of good freezability and the remaining 65% to samples of low freezability. For good freezability samples, supplementation showed no significant effect ( $p > 0.05$ ) in most of post-thaw semen quality parameters, except for SV and HOS. It was observed a decrease in SV when supplemented with different ORAC



levels, being significant ( $p < 0.05$ ) for the low and medium levels. Furthermore, low levels of ORAC showed an HOS increase, while high levels decreased this parameter.

**Figure 4-1:** Post-thaw semen assessment by treatment according to sample freezability.



**Figure 1.** Post-thaw semen assessment by treatment according to sample freezability.

Different letters within bars indicate statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). An ORAC unit was defined as 1  $\mu\text{mol}$  Trolox / 100 g of raw LSP. High ORAC: 24000 ORAC units. Medium ORAC: 14000 ORAC units. Low ORAC: 4000 ORAC units. TM: total motility. PM: progressive motility. SV: sperm vitality. NM: normal morphology. HOS: functional integrity of the cell membrane.

Regarding spermatic kinetic, both good and poor freezability samples had a post-thaw VSL decrease ( $p < 0.05$ ), when supplemented with a high ORAC level respect to control. Also, medium and high levels of ORAC showed an ALH increase for good freezability samples, while poor freezability samples showed lower ALH for a low ORAC level compared to control and the other levels. Conversely, a reduction of BCF for poor freezability samples was found for all treatments (Table 4-4).

**Table 4-4.** Post-thaw spermatic kinetics by samples freezability.

<i>Treatment /Samples Freezability</i>	<b>VCL (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>		<b>VSL (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>		<b>VAP (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>		<b>ALH (<math>\mu\text{m}</math>)</b>		<b>BCF (Hz)</b>	
	<b>Good</b>	<b>Poor</b>	<b>Good</b>	<b>Poor</b>	<b>Good</b>	<b>Poor</b>	<b>Good</b>	<b>Poor</b>	<b>Good</b>	<b>Poor</b>
Control	92.0 $\pm$ 2.75 <sup>a</sup>	69.8 $\pm$ 1.38 <sup>a</sup>	54.1 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup>	39.5 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	72.3 $\pm$ 2.79 <sup>a</sup>	49.5 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>	3.04 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	2.95 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	9.14 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	9.99 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>
Low ORAC	85.8 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>	70.3 $\pm$ 1.78 <sup>a</sup>	49.9 $\pm$ 1.30 <sup>ab</sup>	40.9 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>	66.5 $\pm$ 2.14 <sup>a</sup>	53.2 $\pm$ 1.68 <sup>a</sup>	2.98 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	2.71 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	9.17 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	8.62 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
Medium ORAC	91.1 $\pm$ 1.47 <sup>a</sup>	69.6 $\pm$ 2.24 <sup>a</sup>	47.8 $\pm$ 1.18 <sup>b</sup>	38.2 $\pm$ 1.24 <sup>ab</sup>	67.8 $\pm$ 1.36 <sup>a</sup>	52.2 $\pm$ 1.85 <sup>a</sup>	3.41 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	2.94 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	8.73 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	8.51 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
High ORAC	92.5 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup>	69.7 $\pm$ 1.51 <sup>a</sup>	47.2 $\pm$ 1.34 <sup>b</sup>	35.2 $\pm$ 0.92 <sup>b</sup>	66.8 $\pm$ 1.62 <sup>a</sup>	51.2 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	3.71 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	3.08 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	9.25 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	8.33 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>

Results are presented as mean  $\pm$  standard error. Different letters within columns indicate statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

## 4.4 Discussion

Seminal plasma contains many chemical components with antioxidant properties which together determine its TAC [5] and are part of the antioxidative system, which is able to neutralize or remove certain ROS [24]. Vitamins A, E and C have been described as important cellular protection systems against oxidative damage in stallion semen [25 - 26]. Copper is necessary for many enzymes such as superoxide-dismutase (SOD) involved in antioxidant metabolism [27]. Likewise, calcium and magnesium content has been associated in a high and positive way with seminal plasma TAC [28]. There are different proteins that serve as cellular receptors and transporters of these vitamins and ions, allowing their antioxidant activity in both the plasma membrane and inside the cell [29 - 31]. In addition, enzymes such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase, physiologically control the balance between ROS production and neutralization in stallion semen [32].

There are few reports for measuring TAC on equine seminal plasma. Restrepo et al. [16], obtained a mean of ORAC of  $4049.4 \pm 4031.7 \mu\text{mol Trolox/L}$  of raw seminal plasma of 24 stallions. This result could be considered as superior to that found in this research for the LSP pool ( $13679.4 \pm 911.6 \mu\text{mol Trolox/100 g}$  of raw LSP), since per each L of liquid SP a mean of 21 g of LSP was obtained, for which it would correspond to  $2874.6 \pm 191.4 \mu\text{mol Trolox/L}$  of raw seminal plasma. However, it is important to consider that variability in TAC values can be attributed to the high variability of seminal plasma composition

between individual stallions [33]; since its components can vary by some environmental factors, such as season of collection, temperature, nutrition, and stress [34], and this can influence its TAC. Gürler et al. [35], observed that the amount of TAC differed between bulls, but not between ejaculates within bulls, and related it to sperm quality before and after cryopreservation. On the other hand, Barranco et al. [36], found that measurement of seminal plasma TAC could be a discriminative tool to prognosis fertility in breeding boars.

It is widely known that cryopreservation process reduces semen quality [37], due to osmotic and thermal shocks that induce a ROS increase [38]. In this study, the results show a decrease in post-thaw quality of cryopreserved semen respect to fresh semen (Table 4-2). A decrease in motility of cryopreserved semen has been related to lipid peroxidation of the plasma membrane and alteration of mitochondria [39]; additionally, it is known that damage to the plasma membrane results in irreversible loss of fertilizing capacity of spermatozoa [40]. In this research, the functional and structural integrity of the membrane, were evaluated through the HOS and SYBR14-PI tests (SV), other studies have also reported this simultaneous evaluation, observing a positive correlation between these [41, 42]. There are different factors that may influence the motility and kinetics of cryopreserved equine spermatozoa, such as the extender, the system and rate of freezing, the storage volumes of semen used [43, 44], the age and the breed of the animals [45]. Among these factors, we consider that the breed has an important influence on post-thaw spermatic kinetics, because as in this study, other investigations using the Colombian Creole horse have reported, lower values of VCL (between 60 and 100  $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ) [46, 47] compared with other breeds [43, 44]. On the other hand, Nascimento et al. [48] analyzed sperm freezing in 0.25 and 0.5 mL straws using an automated system and reported higher VCL in frozen-thawed semen stored in 0.25 mL than in 0.5 mL straws. In this study, we used 0.5 mL straws, which could result in lower post-thaw VCL values.

The supplementation of semen extender with either enzymatic or non-enzymatic antioxidants has proven to be effective for scavenging excessive ROS generation and thereby preventing oxidative stress [49]. Seminal plasma represents the most important form of antioxidant defense available to spermatozoa [3], because it contains many chemical components with antioxidant properties, which determine its TAC [36]. The results of this study show that supplementing stallion semen with low and medium ORAC levels of seminal plasma before the freezing process has a positive effect on the post-thaw TM and HOS of spermatozoa (Table 4-3). These results suggest that semen supplemented with low and medium ORAC levels of seminal plasma would undergo less

oxidative stress during cryopreservation, resulting in better sperm cryosurvival measured in terms of post-thaw motile spermatozoa with intact membranes. Similar results were reported by Barranco et al. [36], who showed that seminal plasma TAC contributes to the ability of boar spermatozoa to better sustain preservation, particularly cryopreservation. It has also been proposed that some supplements may increase enzyme activities and TAC against cryodamage [50]. Additionally, seminal plasma TAC in bulls has been negatively correlated with lipid peroxidation of cryopreserved sperm [35]. In the equine species, Restrepo et al. [16], found that TAC evaluated by the ORAC assay had a significant effect on the sperm motility and normal morphology of stallion semen. In humans, it has also indicated a positive relationship between seminal plasma TAC and sperm quality and functionality [51, 52]. Ashrafi et al. [50], observed increases in VAP, VSL and ALH of frozen-thawed bovine semen with the treatment of highest TAC, which shows that this parameter also has direct effects on kinetics of spermatozoa.

In this research, seminal plasma supplementation with medium and high ORAC levels showed a decrease on VSL and SV, while a high ORAC level showed a decrease in post-thaw TM and PM ( $p < 0.05$ ) (Table 4-3). This can be attributed to some antioxidants present in seminal plasma that can become prooxidants [53]; it all depends on their concentration and the nature of neighboring molecules [54]. Vasconcelos et al. [25] found that high concentrations of ascorbic acid supplementation had a negative effect on post-thaw membrane lipid peroxidation of stallion sperm, because in the presence of transition metals, vitamin C makes radicals highly reactive and more destructive, thus generating more free radicals. Prooxidant effects have also been described for  $\alpha$ -tocopherol and phenolic acids, under certain conditions [53].

Some changes considered as descriptive of stallion sperm hyperactivity are a VSL [55], MP and BCF decrease, as well as an ALH increase [56]. Some of these changes were observed for high ORAC level supplementation (Table 4-3). Generally, elevated ALH is not desired because it affects cellular progression; therefore, higher ALH values denote lower seminal quality [57]. On the other hand, VAP and VSL have a strong positive correlation with fertility and can be used to estimate fertility in semen samples [58]; a high ORAC level supplementation yielded low results for both parameters, which could be due to a prooxidant effect and the consequent decrease of seminal quality.

Variability in sperm freezability among stallions is a widely known issue [59]; and even, an intra-individual variation of semen quality and cryosurvival has been described [60]. Different researchers have used the post-thawing PM as a criterion for the definition of stallion semen freezability (poor  $< 35\%$  or good  $> 35\%$ ) [23, 61]. Recently, Vilagran et al.

[62], demonstrated that quantitative differences in seminal plasma composition play an important role in such variability, between ejaculates from boars with good and bad sperm freezability. In this species, ejaculate portions with better or worse sperm cryosurvival were clearly related to those with higher or lower TAC seminal plasma values, respectively [48]. This could explain the results obtained in the present study, because samples with good freezability, and therefore with possible high TAC, would not need ORAC supplementation, showing no significant effect or even a deleterious effect by excess of it (Figure 4-1). In contrast, for poor freezability samples, low and medium ORAC levels of seminal plasma supplementation showed higher results ( $p < 0.05$ ) for post-thaw TM and HOS, which could be explained because they are samples that may have a low TAC, and its supplementation would have beneficial effects on post-thaw semen parameters by reducing ROS. However, high levels of ORAC could generate an excess of some antioxidant compounds and therefore a prooxidant effect, which was observed for HOS and PM of good and poor freezability samples, respectively (Figure 4-1).

A reduction of spermatocinetic parameters between good and poor freezability samples, was found (Table 4-4). In other species, parameters as VAP, VCL, and VSL have been proven to be good indicators of sperm freezability [63, 64] and have even been used as criteria for the classification of good or bad freezability samples [63]. A VSL decrease in both good and poor freezability samples, when supplemented with a high ORAC level, was observed; as well as an increase for ALH with medium and high levels of ORAC supplementation. This may be due to the possible pro-oxidant effect of a high TAC level previously described.

In conclusion, supplementing stallion semen with lyophilized seminal plasma, before the freezing process, can improve its freezability, according to the TAC contribution.

## **4.5 Acknowledgements**

The authors would like to thank Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid for its financial support and the Food Science Laboratory of Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín for its technical support.

## 4.6 References

- [1] Guthrie HD, Welch GR. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*. 2012 ; 78 : 1700–1708
- [2] García BM, Fernández LG, Ferrusola CO, Salazar-Sandoval C, Rodríguez AM, Martínez HR, et al. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reprod Domest Anim*. 2011; 46(1): 141-148.
- [3] Fazeli F, Salimi S. Correlation of seminal plasma total antioxidant capacity and malondialdehyde levels with sperm parameters in men with idiopathic infertility. *Avicenna J Med Biochem*. 2016; Inpress (Inpress): e29736
- [4] Hammadeh M, Filippou A, Hamad M. Reactive oxygen species and antioxidant in seminal plasma and their impact on male fertility. *Int J Fertil Steril* 2009; 3(3): 87-110.
- [5] Johansson M, Bromfield JJ, Jasper MJ, Robertson SA. Semen activates the female immune response during early pregnancy in mice. *Immunology*. 2004; 112(2): 290–300.
- [6] Bromfield JJ. Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. *J Assist. Reprod. Genet*. 2014; 31: 627–636
- [7] Mehrotra A, Katiyar DK, Agarwal A, Das V, Pant KK. Role of total antioxidant capacity and lipid peroxidation in fertile and infertile men. *Biol Res*. 2013; 24 (3): 347-352.
- [8] Oliveira RA, Piersanti RL, Wolf CA, Viu MAO, Gambarini ML. Glutathione for the freezing of cooled equine semen, using different protocols. *Anim. Reprod*. 2014; 11(2): 104-109
- [9] Oldenhof H, Gojowsky M, Wang S, Henke S, Yu C, Rohn K, et al. Osmotic Stress and Membrane Phase Changes during Freezing of Stallion Sperm: Mode of Action of Cryoprotective Agents. *Biol Reprod*. 2013; 88(3): 1-11
- [10] Mahfouz R, Sharma R, Sharma D, Sabanegh E, Agarwal A. Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertil Steril*. 2009; 91(3): 805-811
- [11] Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad Biol Med*. 2000; 29(11): 1106-1114.

- [12] Eroglu M, Sahin S, Durukan B, Ozakpinar OB, Erdinc N, Turkgeldi L, et al. Blood serum and seminal plasma selenium, total antioxidant capacity and coenzyme q10 levels in relation to semen parameters in men with idiopathic infertility. *Biol Trace Elem Res*. 2014; 159: 46–51
- [13] Khosravi F, Valojerdi MR, Amanlou M, Karimian L, Abolhassani F. Relationship of seminal reactive nitrogen and oxygen species and total antioxidant capacity with sperm DNA fragmentation in infertile couples with normal and abnormal sperm parameters. *Andrologia*. 2014; 46: 17–23
- [14] Yildiz S, Öztürkler Y, Ari UC, Lehimcioğlu NC, Atakişi E, Kulaksiz R. The Effects of L-Ergothioneine, N-acetylcystein and Cystein on Freezing of Ram Semen. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2015; 21 (1): 81-86
- [15] Wnuk M, Lewinska A, Oklejewicz B, Bartosz G, Tischner M, Bugno-Poniewierska M. Redox status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude of DNA damage in sperm cells. *Theriogenology*. 2010; 74: 1677–1684
- [16] Restrepo G, Zapata K, Rojano B. Evaluación de la capacidad antioxidante total del plasma seminal equino. *Zootecnia Trop*. 2015; 31 (1): 79-87.
- [17] Gianaroli L, Magli MC, Stanghellini I, Crippa A, Crivello AM, Pescatori ES, et al. DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2012; 97(5): 1067 – 1073
- [18] Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agr Food Chem*. 2001; 49(10): 4619-4626.
- [19] Hidalgo M, Rodriguez I, Dorado J, Sanz J, Soler C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet Med – Czech*. 2005; 50(1): 24-32.
- [20] Brito L, Greene L, Kelleman A, Knobbe M, Turner R. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology*. 2011; 76(4): 745-750.
- [21] Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 1.999; 51(4): 721-727.
- [22] Gamboa S, Rodrigues A, Henriques L, Batista C, Ramalho-Santos J. Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 2010; 73(7): 950-958.

- [23] Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K, Sieme H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Anim Reprod Sci.* 2011; 125(1-4): 112-118.
- [24] Waheed M, El-Bahr SM, Al-haider AK. Influence of seminal plasma antioxidants and osteopontin on fertility of the arabian horse. *J Equine Vet Sci* 2013; 33: 705-709.
- [25] Vasconcelos J, Chaveiro A, Góis A, Moreira da Silva F. Effects of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *J Equine Vet Sci.* 2013; 33: 787-793.
- [26] Yousefian I, Zare-Shahneh A, Zhandi M. The effect of coenzyme q10 and  $\alpha$ -tocopherol in skim milk-based extender for preservation of caspian stallion semen in cool condition. *J Equine Vet Sci.* 2014; 34: 949-954.
- [27] Hamad AWR, Al-Daghistani HI, Shqirat WD, Abdel-Dayem M, Al-Swaif M. Sodium, Potassium, Calcium and Copper Levels in Seminal Plasma are Associated with Sperm Quality in Fertile and Infertile Men. *Biochem Pharmacol.* 2014; 3(4): 141.
- [28] Eghbali M, Alavi-Shoushtari S, Asri-Rezaei S, Ansari M. Calcium, magnesium and total antioxidant capacity (TAC) in seminal plasma of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls and their relationships with semen characteristics. *Vet Res Forum.* 2010;1(1): 12-20.
- [29] Puig S, Thiele D. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6: 171-180.
- [30] Hacquebard M, Carpentier Y. Vitamin E: absorption, plasma transport and cell uptake. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005; 8(2): 133-138.
- [31] Savini I, Rossi A, Pierro C, Avigliano L, Catani M. SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids* 2008; 34: 347-355.
- [32] Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology* 2005; 63(5): 1354-1365.
- [33] Kareskoski M, Katila T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim Reprod Sci.* 2008; 107:249-56.
- [34] Juyena NS, Stelletta C. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *J Androl.* 2012; 33(4): 536-551.



- [35] Gürler H, Calisici O, Bollwein H. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. *Anim Reprod Sci.* 2015; 155: 99-105.
- [36] Barranco I, Tvarijonaviciute A, Perez-Patiño C, Parrilla I, Ceron JJ, Martinez EA, et al. High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. *Sci Rep.* 2015; 21 (5): 18538.
- [37] Candeias ML, Alvarenga MA, Carmo MT, Ferreira HN, Souto MR, Torres RA, et al. Semen cryopreservation protocols of Mangalarga Marchador stallions. *R. Bras. Zootec.* 2012; 41 (9): 1989-1995.
- [38] Hussain J, Salam A, Gohar A. A Study on the Cryopreservation of Stallion Semen with Alpha Lipoic Acid. *Intl. Res. J. Pharm.* 2011; 1 (1): 21-26.
- [39] Darr C, Martorana K, Scanlan T, Meyers S. The effect of low oxygen during the early phases of sperm freezing in stallions with low progressive motility: can we improve post-thaw motility of stallion sperm? *J Equine Vet Sci* 2016;42: 44-51.
- [40] Aurich C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2005;89(1–4): 65-75
- [41] Brito L, Barth A, Bilodeau-Goeseels S, Panich P, Kastelic J. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* 2003; 60(8):1539-1551.
- [42] Contreras-Mendez L, Medrano A. A comparative study of two cooling protocols on stallion sperm cryosurvival. *Andrologia* 2016; 48: 558-563.
- [43] Salazar JL, Teague SR, Love CC, Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD. Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology.* 2011; 76: 409–418
- [44] Dias Maziero RR, Guasti PN, Monteiro GA, Avanzi BR, Hartwig FP, Lisboa FP, Martin I, Papa FO. Evaluation of Sperm Kinetics and Plasma Membrane Integrity of Frozen Equine Semen in Different Storage Volumes and Freezing Conditions. *J Equine Vet Sci.* 2013; 33: 165-168
- [45] Dowsett KF, Knott LM. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology.* 1996; 46: 397 – 412.

- [46] Restrepo GB, Duque JE, Rojano BA. Efecto de la quercetina, la L-ergotioneina y la pentoxifilina en el semen equino posdescongelado. *Rev. Salud Anim.* 2016; 38 (3): 154-163
- [47] Usuga A, Restrepo G, Rojano B. Criotolerancia del Semen Equino, Estabilidad Oxidativa y Componentes del Plasma Seminal. *Rev Inv Vet Perú* 2016; 27(3): 505-517.
- [48] Nascimento J, Raphael CF, Andrade AFC, Alonso MA, Celeghini ECC, Arruda RP. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *J Equine Vet Sci.* 2008; 28: 351-8.
- [49] Agarwal A, Durairajanayagam D, Du Plessis SS. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2014; 24: 12–112.
- [50] Ashrafi I, Kohram H, Tayefi-Nasrabadi H. Antioxidant effects of bovine serum albumin on kinetics, microscopic and oxidative characters of cryopreserved bull spermatozoa. *Span J Agric Res* 2013 11(3): 695-701.
- [51] Benedetti S, Tagliamonte MC, Catalani S, Primiterra M, Canestrari F, De Stefani S, et al. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reprod. Biomed.* 2012; 25: 300–306.
- [52] Pahune PP, Choudhari AR, Muley PA. The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects. *J Clin. Diagn. Res.* 2013; 7: 991–995.
- [53] Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013; 51: 15-25.
- [54] Villanueva C, Kross RD. Antioxidant-induced stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 2091-2109.
- [55] McPartlin L, Suarez S, Czaya C, Hinrichs K, Bedford-Guaus S. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful in vitro fertilization of equine oocytes. *Biol Reprod.* 2009; 81: 199-206.
- [56] Orgies F, Klewitz J, Görgens A, Martinsson G, Sieme H. Effect of procaine, pentoxifylline and trolox on capacitation and hyperactivation of stallion spermatozoa. *Andrologia.* 2012; 44: 130-138.

- [57] Oliveira RA, Wolf CA, Oliveira MA, Gambarini ML. Addition of Glutathione to an Extender for Frozen Equine Semen. *J Equine Vet Sci.* 2013; 33: 1148 – 1152.
- [58] Kathiravan P, Kalatharan J, Edwin MJ, Veerapandian C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim Reprod Sci* 2008; 104: 9–17.
- [59] Prien S, Iacovides S. Cryoprotectants & Cryopreservation of Equine Semen: A Review of Industry Cryoprotectants and the Effects of Cryopreservation on Equine Semen Membranes. *J Dairy Vet Anim Res.* 2016; 3(1): 00063.
- [60] Sieme H, Oldenhof H, Martinsson G, Burger D, Wolkers WF. Equine semen cryopreservation: inter-individual variation, centrifugation processing, protective agents, and freezing protocols. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2015; 39 (1): 11-14.
- [61] Vidament M, Dupere AM, Julienne P, Evain A, Noue P, Palmer E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology.* 1997; 48, 907–917.
- [62] Vilagran I, Yeste M, Sancho S, Castillo J, Oliva R, Bonet S. Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology.* 2015; 3(2): 345-356.
- [63] Ros-Santaella JL, Domínguez-Rebolledo AE, Garde JJ. Sperm Flagellum Volume Determines Freezability in Red Deer Spermatozoa. *Plos One.* 2014; 9(11): e112382
- [64] Nuñez-Martínez I, Morán JM, Peña FJ. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *J Androl.* 2006; 27: 596–603.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

Con la realización de esta investigación se establecieron las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos c.+199A>G, c.+566C>A, c.+622G>A y c.+716A>G dentro del gen CRISP-3 en equinos, encontrándose una asociación con la calidad del semen criopreservado en esta especie. Para el polimorfismo c.+199A>G y c.+622G>A, el genotipo AA mostró los mejores resultados para la movilidad total, progresiva y la integridad de membrana espermática en el semen equino post-descongelación; mientras que para el polimorfismo c.+566C>A, el genotipo CC estuvo asociado con una mayor movilidad total y progresiva del espermatozoide y un menor porcentaje de anomalías espermáticas luego del proceso de congelación.

Esta investigación es la primera aproximación y podría convertirse en el punto de partida para el estudio de marcadores genéticos candidatos de congelabilidad del semen en el Caballo Criollo Colombiano. Con el desarrollo de esta tesis, no sólo se evaluó el marcador molecular CRISP-3 desde el punto de vista genético, sino también bioquímico, mediante la cuantificación de la proteína CRISP-3 en el plasma seminal equino, estableciéndose que un alto nivel de esta proteína está asociado a una mayor movilidad, cinética, viabilidad y morfología del semen criopreservado. Lo anterior, podría emplearse como una herramienta de diagnóstico útil en los programas de selección de los reproductores equinos, para la identificación temprana de ejemplares con buena respuesta a los procesos de congelación de semen, con el fin de mejorar la eficiencia en la aplicación de otras biotecnologías reproductivas.

Se realizaron mediciones de diferentes componentes del plasma seminal como proteínas totales, iones y vitaminas, encontrándose una alta variabilidad de los mismos entre equinos. Se estableció que la composición del plasma seminal influye en la calidad del semen fresco, y que un alto nivel de vitamina E, cobre, hierro y zinc está asociado

con una mayor integridad de la membrana espermática. Así mismo, se encontró que la composición del plasma seminal equino liofilizado, suplementado para el proceso de congelación es determinante en la calidad post-descongelación del semen. El estudio del perfil bioquímico del plasma seminal realizado con este trabajo, permitió identificar componentes asociados positiva y negativamente con la congelabilidad del semen equino, a partir de lo cual se podrían generar estrategias de suplementación del semen durante la criopreservación e incluso esquemas de selección de reproductores, con la finalidad de mejorar los índices de calidad del semen criopreservado de equinos de la raza criollo colombiano.

Se demostró que la suplementación del plasma seminal liofilizado de acuerdo a su capacidad antioxidante total antes del proceso de congelación, influye en la calidad del semen criopreservado, mostrando un efecto benéfico evidente en muestras de baja congelabilidad, en las que se encontró una mayor movilidad total e integridad de la membrana espermática, cuando se suplementaron con plasma seminal con un nivel bajo y medio de capacidad antioxidante. Estos hallazgos podrían aplicarse como una estrategia para mejorar la baja congelabilidad seminal de muchos de los reproductores equinos en nuestro medio. Además la suplementación con plasma seminal a partir de su capacidad antioxidante total, podría ser una alternativa más económica y sencilla que la medición y suplementación de sus componentes individuales; así mismo, podrían generarse esquemas de suplementación con el aporte antioxidante apropiado de acuerdo a la congelabilidad de la muestra seminal, lo cual podría generar resultados más consistentes.

## A. Appendix 1. Supporting Information (Table S1)

**Table S1.** Primers used for amplification of SNPs within CRISP3 gene.

<b>SNP</b>	<b>Position</b>	<b>Forward primer sequence (5' &gt; 3')</b>	<b>Reverse primer sequence (5' &gt; 3')</b>	<b>T<sub>M</sub> (°C)</b>	<b>Product length (bp)</b>
<i>CRISP3</i> <i>c.+199 A&gt;G</i>	58654	GGAGCAGAAAAAGG CACATC	TGCTGCCTTTTTCAAG TGAA	62	392
<i>CRISP3</i> <i>c.+566 C&gt;A</i>	65296	TATCCGCAGTGAAC ATTGGA	ATGCAAACACAAAAT GATTACTCA	62	375
<i>CRISP3</i> <i>c.+622 G&gt;A</i>	67301				
<i>CRISP3</i> <i>c.+716 A&gt;G</i>	67395	CGCTGAGCTTTGTC CAGTCCT	TGATTCCAAACCGTAA TGCA	62	354