

Evaluación de la capacidad antioxidante total del plasma seminal equino

Evaluation of total antioxidant capacity of equine seminal plasma

Giovanni Restrepo Betancur^{1*}, Karol Zapata Acosta² y Benjamín A. Rojano³

¹Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Facultad de Ciencias Agrarias. Medellín, Colombia. *Correo electrónico: grestrepo@elpoli.edu.co. ²Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Medellín, Colombia. Correo electrónico: kzapatilla@gmail.com. ³Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Medellín, Colombia. Correo electrónico: brojano@unal.edu.co.

RESUMEN

La capacidad antioxidante del plasma seminal podría ser definitiva para el mantenimiento de la viabilidad y la fertilidad del semen equino. El propósito de este estudio fue determinar la capacidad antioxidante total (CAT) y los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) del plasma seminal equino, y su relación con la calidad espermática. Se utilizaron 24 muestras de plasma seminal de caballos Criollos Colombianos. La producción de ERO se evaluó por la prueba de fluoresceína diacetato (FDA), y la CAT por los ensayos de capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC), decoloración del radical catiónico ABTS^{••} (ABTS) y poder reductor férrico (FRAP). La evaluación estadística se realizó mediante el ajuste de modelos lineales generalizados (GLM) y análisis de correlación. Las medias de producción de ERO, ORAC, ABTS y FRAP fueron de 0,74 URF/min, 4.049,4 μmol Trolox equivalente / l, 3.347,8 μmol Trolox equivalente / l y 23,9 mg de ácido ascórbico equivalente / l, respectivamente. Se encontró un efecto significativo ($P < 0,05$) de ORAC sobre la movilidad y la morfología espermática. Los valores de ORAC, ABTS y FRAP presentaron correlaciones altas y positivas con la concentración seminal, mientras la producción de ERO estuvo correlacionada de forma negativa con la vitalidad y la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Se determinó que los niveles de ERO y CAT del plasma seminal están relacionados con la calidad del semen equino. Este es el primer reporte de evaluación de la CAT del plasma seminal equino mediante las metodologías ORAC y FRAP.

Palabras clave: antioxidantes, especies reactivas de oxígeno, fertilidad, caballos sementales.

ABSTRACT

The antioxidant capacity of seminal plasma could be definitive for maintaining the viability and functionality of equine semen. The purpose of this study was to determine the total antioxidant capacity (TAC) and the levels of production of reactive oxygen species (ROS) of equine seminal plasma, and its relationship with sperm quality. 24 samples of seminal plasma of Colombian Creole horses were used. ROS production was assessed by fluorescein diacetate test (FDA), and TAC by assays of oxygen radical scavenging capacity (ORAC), ABTS^{••} radical cation discoloration (ABTS) and ferric reducing power (FRAP). Statistical evaluation was performed by fitting generalized linear models (GLM) and correlation analysis. The means of ROS production, ORAC, ABTS and FRAP were 0.74 RFU / min, 4049.4 μmol Trolox equivalent / l, 3347.8 μmol Trolox equivalent / l and 23.9 mg ascorbic acid equivalent / l, respectively. A significant effect ($P < 0.05$) of ORAC on motility and sperm morphology was found. The values of ORAC, ABTS and FRAP showed high and positive correlations with seminal concentration, while ROS production was negatively correlated with vitality and integrity of the sperm plasma membrane. It was determined that levels of ROS and CAT of seminal plasma are associated with equine sperm quality. This is the first report of TAC evaluation of equine seminal plasma using ORAC and FRAP assays.

Key words: antioxidants, reactive oxygen species, fertility, stallions.

Recibido: 09/11/14 Aprobado: 13/10/15

INTRODUCCIÓN

La calidad del semen equino es determinante para el éxito de la inseminación artificial y la producción de embriones, así como es definitiva en el nivel de tolerancia de los espermatozoides a la criopreservación. El plasma seminal, secretado por las glándulas accesorias durante la eyaculación, facilita el transporte, la nutrición y la protección de los espermatozoides en el aparato genital femenino (Katila y Kareskoski, 2006). Adicionalmente, tiene importantes funciones en el metabolismo espermático y en el proceso de fertilización (Guasti *et al.*, 2012). Entre los diversos componentes del plasma seminal equino, se han identificado de forma individual antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, los cuales tendrían como función proteger los espermatozoides de los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno (ERO), con un consecuente impacto positivo sobre la conservación de la fertilidad (Kankofer *et al.*, 2005; Waheed *et al.*, 2013). De igual forma, se han caracterizado otros componentes del plasma seminal, algunos de los cuales podrían intervenir en la función antioxidante del semen (Pesch *et al.*, 2006).

La cooperación entre los diferentes antioxidantes, proporciona una mayor protección contra el ataque de las ERO que cualquier compuesto por sí solo; por lo tanto, la capacidad antioxidante total (CAT) puede dar más información biológicamente relevante, que la obtenida a partir de la medición de concentraciones de antioxidantes individuales (Ghiselli *et al.*, 2000). A pesar de esto, se conoce muy poco sobre la CAT del plasma seminal equino, y del efecto que ejerce sobre la integridad y la funcionalidad de los espermatozoides.

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^{•+}) (Fingerova *et al.*, 2007). Éstos métodos 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. No se conocen reportes de evaluación de la CAT en plasma seminal equino mediante los ensayos ORAC y FRAP, sin embargo ORAC ha sido utilizado en plasma sanguíneo (Wang *et al.*, 2004), mientras FRAP ha sido empleado en semen y plasma seminal humano (Yadav *et al.*, 2006; Pahune *et al.*, 2013). Estudios realizados por Ball *et al.* (2001) y Morrell *et al.* (2013) han evaluado la producción de ERO en semen equino. El objetivo de este estudio fue determinar la CAT y los niveles de producción de ERO del plasma seminal de caballos de la raza Criollo Colombiano, y su relación con la calidad seminal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Doce caballos (*Equus caballus*) de la raza Criollo Colombiano, ubicados en el norte del departamento de Antioquia (Colombia), fueron utilizados para la colecta de dos eyaculados por animal, para un total de 24 muestras seminales. Los caballos fueron sometidos a una colecta semanal, las edades estuvieron comprendidas entre los 4 y 12 años, todos en edad reproductiva con fertilidad comprobada por crías nacidas vivas y con una condición corporal entre 6 y 8, de acuerdo a criterios descritos por Warren (2009). La colecta del semen se realizó de acuerdo a lo descrito por Miró-Arias *et al.* (2011), utilizando una vagina artificial modelo Missouri, lubricada con gel no espermicida y sobre una yegua. La fracción en gel del eyaculado fue retirada por filtración.

Paracada muestra de semen se evaluó el volumen del eyaculado (tubo graduado) y la concentración seminal mediante un espectrofotómetro (Spermacue[®], Minitube). Mediante microscopía de contraste de fase (Eclipse E200[®], Nikon) se evaluó la movilidad progresiva (Gamboa y Ramalho-Santos, 2005), la morfología normal y la vitalidad de los espermatozoides a través de la tinción con eosina-nigrosina (Brito *et al.*, 2011), y la integridad de la membrana plasmática por la prueba hiposmótica (HOS), de acuerdo a lo reportado por Neild *et al.* (1999). Un volumen de 10 ml de semen por eyaculado fue separado en un tubo graduado y centrifugado a 1.200 x g durante 15 minutos, se recuperó un volumen aproximado por muestra de 8 ml de plasma seminal (sobrenadante). El plasma seminal fue

transportado al laboratorio en un dispositivo de refrigeración (Equitainer®, Hamilton Research) y posteriormente fue almacenado en condiciones de congelación (-20°C).

El plasma seminal fue descongelado en un baño de agua a 35°C, y luego se realizó la medición de los niveles de producción de ERO y de CAT. La detección de la producción de ERO se realizó por la metodología de la fluoresceína diacetato (FDA) (Guthrie y Welch, 2006). Cada muestra se preparó con 30 µl de FDA (Molecular Probes®) a 40 mM, 240 µl de una solución buffer (pH 7,4) y 30 µl de plasma seminal. Se utilizaron condiciones controladas de temperatura a 37°C, pH 7,4. Las lecturas se realizaron mediante un espectrofluorímetro LS 55 (Perkin Elmer), a una longitud de onda (λ) de excitación de 490 nm y un slit (rendija) de excitación de 10 nm, y una λ de emisión de 530 nm y un slit de emisión de 15 nm. En ambos casos, los slit fueron definidos a partir de resultados preliminares de evaluación de la emisión de fluorescencia, en un rango entre 2,5 nm a 15 nm. Las lecturas se efectuaron por triplicado.

La evaluación de la CAT del plasma seminal se realizó mediante las metodologías ORAC, ABTS y FRAP. El ensayo ORAC se realizó de acuerdo a lo reportado por Ou *et al.* (2001). Se utilizaron soluciones de fluoresceína 1×10^{-5} M en PBS (75 mM - pH 7,4) y de AAPH 0,6 M en PBS (75 mM, pH 7,4). Cada tubo de reacción se preparó con 21 µl de fluoresceína, 2.899 µl de PBS, 30 µl de plasma seminal y 50 µl de AAPH (Sigma). Se emplearon condiciones controladas de temperatura a 37°C y pH 7,4, adicionalmente se usó Trolox® (Merck) como antioxidante referencia. Las lecturas se realizaron por espectrofluorimetría (Perkin Elmer LS 55) a una λ de excitación de 493 nm y un slit de excitación de 5 nm, y una λ de emisión de 515 nm y un slit de emisión de 15 nm, con atenuador del 1%. El efecto antioxidante de las muestras fue calculado usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína entre el blanco y la muestra, lo cual se comparó contra una curva patrón con Trolox®.

El ensayo ABTS se realizó de acuerdo a lo descrito por Arts *et al.* (2004). Se emplearon 10 µl de plasma seminal y 990 µl de la solución del radical ABTS*. Luego de 30 minutos de reacción

a temperatura ambiente y en la oscuridad, se midió en un espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/Vis), el cambio en la absorbancia respecto a una solución referencia, compuesta por 10 µl de solución buffer y 990 µl de la solución del radical ABTS*. El radical fue generado por oxidación de 3,5 mM de ABTS con 1,25 mM de persulfato de potasio. Después de 24 horas de reacción, se ajustó la absorbancia con PBS a pH 7,4 hasta 0,70 unidades, a una λ de 732 nm y se comparó contra una curva patrón con Trolox®.

Para el método FRAP, 50 µl de plasma seminal se adicionaron a 900 µl de una solución de FRAP (Buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3,4), TPTZ, FeCl₃, en relación 10:1:1). Luego de 30 minutos de reacción se determinó la absorbancia a una λ de 593 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/Vis). El valor encontrado se comparó con una curva de referencia construida con ácido ascórbico como patrón primario (Benzie y Strain, 1996).

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SAS 9,1 (Inst. Cary, NC). Se realizó un análisis descriptivo de las variables de calidad seminal, producción de ERO y CAT. Mediante el comando PROC UNIVARIATE se realizaron pruebas de normalidad para cada variable. Con PROC GLM se ajustaron modelos lineales generalizados (GLM), para la evaluación por análisis de varianza de la movilidad espermática, la vitalidad espermática, la morfología normal y la integridad de membrana (HOS). Se incluyeron en cada modelo, los efectos fijos de la producción de ERO y la CAT evaluada por los diferentes métodos, con el fin de evaluar su asociación con las variables dependientes.

La estructura general de los modelos lineales ajustados, fue la siguiente: $Y_{ijklmno} = \mu + E_i + ERO_j + ORAC_k + ABTS_l + FRAP_m + C_n + e_{ijklmno}$, donde: $Y_{ijklmno}$, fue la movilidad espermática, la vitalidad espermática, la morfología normal o la integridad de la membrana; μ , la media general; E_i , el efecto fijo del equino; ERO_j , el efecto fijo de la producción de ERO; $ORAC_k$, el efecto fijo de la actividad antioxidante ORAC; $ABTS_l$, el efecto fijo de la actividad antioxidante ABTS; $FRAP_m$, el efecto fijo de la actividad antioxidante FRAP; C_n , el efecto fijo de la(s) covariable(s) de calidad seminal; y $e_{ijklmno}$, el error experimental. Como

covariables fueron considerados los efectos fijos del volumen y la concentración del eyaculado.

Las comparaciones de medias para los efectos significativos, se realizaron mediante la prueba de Tukey (HSD). Se efectuaron análisis de correlación (Pearson) entre los parámetros estudiados. El nivel de significancia fue $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de las muestras de semen ($n=24$) de caballos de la raza Criollo Colombiano, arrojó los resultados que se describen en el Cuadro 1. De acuerdo a los coeficientes de variación (CV) encontrados, a excepción de la morfología normal que presentó una baja variabilidad ($CV < 20\%$), los demás parámetros de calidad seminal tuvieron un nivel medio de variabilidad ($CV: 20-40\%$). Los resultados hallados para los parámetros de calidad seminal en caballos criollos colombianos, fueron cercanos a los reportados por Mesa (2010) y Restrepo *et al.* (2012).

A partir de las muestras de plasma seminal se encontraron los resultados de producción de ERO y CAT que se describen en el Cuadro 2. Se halló una alta variabilidad ($CV > 40\%$) en los resultados de ERO y de CAT para los diferentes ensayos de medición utilizados (ORAC, ABTS y FRAP), al igual que un amplio rango entre los valores mínimo y máximo encontrados para cada uno de ellos. La excesiva producción de

ERO en el semen equino ha sido relacionado con alteraciones de la cromatina, las membranas y las proteínas de los espermatozoides (Ball, 2009); así como con el descenso de la movilidad (Baumber *et al.*, 2000).

De igual forma, se conoce que los espermatozoides alterados y anormales generan mayores cantidades de ROS, las cuales pueden contribuir con la reducción de la fertilidad y la presentación de problemas relacionados con la preservación de semen (Ball *et al.*, 2001). Sin embargo, pocos estudios han evaluado la producción de ERO en el semen equino fresco (Morrell *et al.*, 2013), y son escasas las referencias de evaluación de la producción de ERO en el plasma seminal equino.

Pese a, que la mayoría de la capacidad antioxidante del semen equino se encuentra en el plasma seminal (Ball, 2008), y que la producción de ERO ha sido asociada a la actividad metabólica de los espermatozoides (Vasconcelos *et al.*, 2010), los resultados de esta investigación, muestran que el plasma seminal por sí solo, es capaz de generar ERO (medidas por la metodología FDA descrita previamente), como se observa en el Cuadro 2. De tal manera, que las ERO del plasma seminal podrían igualmente contribuir con la presentación de alteraciones espermáticas, mediante moléculas como el peróxido de hidrógeno, conocido como la principal ERO causante de citotoxicidad en el semen equino (Burnaugh *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Análisis descriptivo de los parámetros de calidad del semen equino fresco.

Parámetro	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación*	Mínimo	Máximo
Volumen (ml)	43,9	15,6	35,6	15,0	75,0
Concentración ($\times 10^6/ml$)	194,7	71,3	36,6	119,0	473,0
Movilidad espermática (%)	62,0	14,3	23,1	30,0	85,0
Vitalidad espermática (%)	73,6	16,8	22,9	30,0	92,0
Morfología normal (%)	74,9	14,4	19,2	21,0	92,0
Integridad de membrana (%)	59,3	17,3	29,1	19,0	87,0

*El coeficiente de variación se expresa como porcentaje (%).

Cuadro 2. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y capacidad antioxidante total (CAT) del plasma seminal equino.

Parámetro	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
ERO	0,74	0,31	41,89	0,00	1,38
ORAC	4.049,41	4.031,73	99,56	802,00	19.225,60
ABTS	3.347,83	2.975,86	88,88	68,86	11.653,73
FRAP	23,91	20,06	83,89	2,39	91,43

ERO: Especies reactivas de oxígeno. ORAC: capacidad atrapadora de radicales oxígeno. ABTS: decoloración del radical catiónico ABTS^{•+}. FRAP: Poder reductor férrico. ERO expresadas en unidades relativas de fluorescencia (URF) / minuto. ORAC y ABTS expresadas como μM de Trolox equivalente / l, y FRAP como mg de ácido ascórbico equivalente / l.

Esto dependería fundamentalmente de que los mecanismos de acción antioxidante sean rebasados por una excesiva generación de ERO, configurándose una condición de estrés oxidativo (Aitken, 2006).

En este estudio, la acción perjudicial de las ERO del plasma seminal sobre los espermatozoides equinos podría hacerse evidente, toda vez que se encontró un efecto significativo de las ERO sobre la movilidad espermática (Cuadro 3), al igual que se hallaron coeficientes de correlación negativos y significativos ($P < 0,05$), entre la producción de ERO y los parámetros de vitalidad espermática ($r = -0,40$) e integridad de la membrana plasmática ($r = -0,47$).

La CAT del plasma seminal podría atribuirse a la acción conjunta de diversas moléculas con actividad antioxidante. Se ha encontrado que el plasma seminal equino posee una amplia variedad de componentes como iones, enzimas y moléculas de bajo peso molecular (Pesch *et al.*, 2006; Waheed *et al.*, 2013), muchos de los cuales son conocidos por su actividad directa o indirecta en fenómenos oxidativos. Son pocos los estudios donde se evalúa la CAT del plasma seminal equino, no obstante, Wnuk *et al.* (2010), empleando el ensayo ABTS, encontraron una correlación negativa entre la CAT y el daño del ADN de los espermatozoides.

Adicionalmente, observaron una amplia variación interindividual en la CAT del plasma seminal equino, tal como se observó en esta investigación, de acuerdo a los altos coeficientes de variación

encontrados (Cuadro 2). De otro lado, aunque no se conocen reportes de evaluación de la CAT mediante los ensayos ORAC y FRAP en el plasma seminal equino, podrían tomarse como referencia valores ORAC y FRAP encontrados en plasma sanguíneo (9.500 $\mu\text{mol/L}$, Wang *et al.*, 2004) y plasma seminal humano (213 mg/L, Pahune *et al.*, 2013), respectivamente.

Aquellos métodos para la evaluación de la CAT cuyo mecanismo de acción antioxidante se fundamenta en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante a la ERO se clasifican como HAT (Hydrogen Atom Transfer), como es el caso de ORAC, mientras aquellos cuyo mecanismo se fundamenta en la donación de un electrón, se clasifican como SET (Single Electron Transfer), como en el caso de FRAP. El ensayo ABTS a pesar de que es usualmente clasificado como SET, puede neutralizar tanto por reducción directa vía transferencia de electrones, como atrapando radicales mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno (Prior *et al.*, 2005). De acuerdo a esto, el uso simultáneo de los métodos ORAC, FRAP y ABTS, podría proveer un diagnóstico amplio y posiblemente más acertado de la CAT del plasma seminal equino. Aunado a, los análisis de correlación realizados en este estudio, arrojaron en todos los casos correlaciones altas y positivas ($r > 0,70$) entre los métodos de evaluación de la CAT (ORAC, ABTS y FRAP).

Mediante el análisis de los modelos (GLM) para las variables de calidad del semen equino

(Cuadro 3), se encontraron altos coeficientes de determinación (R^2), de acuerdo a lo cual se infiere que los efectos incluidos explican en una gran proporción la variabilidad propia de cada variable dependiente estudiada. La significancia ($P<0,05$) del efecto del reproductor (equino) en la mayoría de los parámetros de calidad seminal, denota tal como se mencionó previamente, la importancia de la variabilidad interindividual en muchos de los aspectos evaluados en el semen equino. No se encontró significancia ($P<0,05$) del volumen o la concentración del eyaculado, como covariables incluidas en los modelos ajustados.

Se encontró que la CAT del plasma seminal equino, evaluada por el ensayo ORAC, presentó un efecto significativo ($P<0,05$) sobre la movilidad espermática y la morfología normal del semen equino, por lo cual se establecieron tres categorías de nivel ORAC (alto, medio y bajo), con el fin establecer mediante comparación de medias (Tukey), su influencia sobre los parámetros espermáticos mencionados (Cuadro

4). Se observó que las muestras de plasma seminal con altos niveles ORAC presentaron un incremento significativo ($P<0,05$) en la morfología normal de los espermatozoides, mientras no se encontró efecto de la categoría de ORAC sobre la movilidad espermática.

Por otro lado, se hallaron coeficientes de correlación significativos ($P<0,05$) entre la concentración espermática y la CAT evaluada por los ensayos ABTS ($r= 0,62$), ORAC ($r= 0,78$) y FRAP ($r= 0,57$); y entre el volumen del eyaculado y el ensayo ORAC ($r= -0,40$). De manera que, de forma preliminar podría esperarse que los eyaculados con una alta concentración de espermatozoides, tengan una mayor CAT, mientras que un alto volumen seminal podría correlacionarse de forma negativa con la CAT del plasma seminal. De acuerdo a todo lo anterior, la evaluación de la CAT del plasma seminal equino, podría constituirse en una herramienta diagnóstica complementaria para la evaluación de la calidad seminal, tal

Cuadro 3. Resultados de los modelos lineales generalizados (GLM) ajustados para las variables de calidad seminal.

Variable dependiente	n	Media	Valor de P*	R^2	Efectos significativos*
Movilidad espermática	24	62,00	0,005	0,94	Equino, ERO, ORAC
Vitalidad espermática	24	73,64	0,025	0,92	Equino
Morfología normal	24	74,92	0,004	0,95	Equino, ORAC
Integridad de membrana	24	59,34	0,151	0,86	

*Nivel de significancia con $P<0,05$. R^2 : coeficiente de determinación. ERO: Especies reactivas de oxígeno. ORAC: ensayo de la capacidad atrapadora de radicales oxígeno.

Cuadro 4. Comparación de medias por categorías de ORAC para la movilidad y la morfología espermática.

Categoría ORAC	n	Morfología normal (%)*	Movilidad espermática (%)*
Alto (>400)	7	83,58 ^a	65,71 ^a
Medio (200-400)	11	73,42 ^b	58,75 ^a
Bajo (<200)	6	67,84 ^b	64,16 ^a

ORAC: capacidad atrapadora de radicales oxígeno. Los rangos por categoría de ORAC son expresados en μM de Trolox equivalente / l. *Letras diferentes (columnas) indican diferencia estadística significativa ($P<0,05$).

como se había planteado previamente (Wnuk *et al.*, 2010). Estudios futuros podrían enfocarse en determinar la influencia de la CAT sobre la capacidad fecundante o la fertilidad del semen equino.

CONCLUSIONES

Los altos niveles de especies reactivas de oxígeno ejercen un efecto negativo sobre la calidad espermática. A su vez la capacidad antioxidante total del plasma seminal, está asociada a diferentes indicadores de calidad del semen de caballos Criollos Colombianos, encontrándose una relación directa entre el nivel ORAC y la morfología normal. Los ensayos ORAC y FRAP, al igual que el ensayo ABTS, pueden considerarse como metodologías apropiadas para la evaluación de la capacidad antioxidante total del plasma seminal equino, siendo el método ORAC el que posiblemente tendría un mayor valor predictivo de la calidad seminal por su relación con la movilidad y la morfología espermática. Este estudio se constituye como pionero en la evaluación de la CAT del plasma seminal equino mediante los ensayos ORAC y FRAP.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Dirección de Investigación y Posgrados del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Antioquia, Colombia. Agradecidos con el personal de los Laboratorios en Biotecnología Animal del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid y del Laboratorio de Química de los Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

LITERATURA CITADA

- Aitken, R. 2006. Sperm function test and fertility. *Int J Androl.*, 9(1): 69-75. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16466526>. [Nov. 09, 2014].
- Arts, M., S. Dallinga, H. Voss, G. Haenen and A. Bast. 2004. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.*, 88(4):567-570. Disponible en línea: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604001591>. [Nov. 09, 2014].
- Ball, B. 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci.*, 107(3-4):257-267. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18524506>. [Nov. 09, 2014].
- Ball, B. 2009. Role of oxidative stress in normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Rev Bras Reprod Anim.*, 33(6):20-24. Disponible en línea: http://uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2012/paola_artigo4_oxidative.pdf. [Nov. 09, 2014].
- Ball, B., A. Vo and J. Baumber. 2001. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res.*, 62(4):508-515. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11327456>. [Nov. 09, 2014].
- Baumber, J., B. Ball, C. Gravance, V. Medina and M. Davies-Morel. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J Androl.*, 21(6):895-902. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11105916>. [Nov. 09, 2014].
- Benzie, I. and J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. *Anal Biochem.*, 239(1):70-76. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8660627>. [Nov. 09, 2014].
- Brito, L., L. Greene, A. Kelleman, M. Knobbe and R. Turner. 2011. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology.* 76(4):745-750. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21612814>. [Nov. 09, 2014].
- Burnaugh, L., K. Sabeur y B. Ball. 2007. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology.*, 67(3):580-589. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311111>. [Nov. 09, 2014].

- www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045638. [Nov. 09, 2014].
- Fingerova, H., J. Novotny, J. Barborik, J. Brezinova, M. Svobodova, M. Krskova and I. Oborna. 2007. Antioxidant capacity of seminal plasma measured by Tas Randox®. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 151(1):37-40. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17690737>. [Nov. 09, 2014].
- Gamboa, S. y J. Ramalho-Santos. 2005. SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. *Theriogenology*. 64(2):275-291. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15955353>. [Nov. 09, 2014].
- Ghiselli, A., M. Serafini, F. Natella and C. Scaccini. 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad Biol Med.*, 29(11):1106-1114. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121717>. [Nov. 09, 2014].
- Guasti, P., G. Monteiro e F. Papa. 2012. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. *Veterinária e Zootecnia.*, 19(2):169-180. Disponible en línea: <http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/332>. [Nov. 09, 2014].
- Guthrie, H. y G. Welch. 2006. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci.*, 84:2089-2100. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16864869>. [Nov. 09, 2014].
- Katila, T. and M. Kareskoski. 2006. Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. *Pferdeheilkunde.*, 22(2):193-200. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18556156>. [Nov. 09, 2014].
- Kankofer, M., G. Kolm, J. Aurich and C. Aurich. 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology.*, 63(5):1354-1365. Disponible en línea: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04002419>. [Nov. 09, 2014].
- Mesa, A. 2010. Efecto del colesterol y la dimetil formamida sobre la criosupervivencia de espermatozoides de caballos criollos colombianos. Tesis de M.Sc. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellín, Colombia. 34 p. Disponible en línea: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2614/1/43984608.2010.pdf>. [Nov. 09, 2014].
- Miró-Arias, M., A. Vallecillo, J. León y J. Vega-Pla. 2011. Efecto del semental sobre las características seminales del caballo de las retuertas. *Arch Zootec.*, 60(231):345-348. Disponible en línea: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0004-05922011000300007&script=sci_arttext. [Nov. 09, 2014].
- Morrell, J., C. Winblad, A. Georgakas, G. Stuhmann, P. Humblot and A. Johannisson. 2013. Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. *Anim Reprod Sci.*, 140(1-2):62-69. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778304>. [Nov. 09, 2014].
- Neild, D., G. Chaves, M. Flores, N. Mora, M. Beconi and A. Agüero. 1999. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology.*, 51(4):721-727. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10728997>. [Nov. 09, 2014].
- Ou, B., M. Hampsch-Woodill and R. Prior. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem.*, 49(10):4619-4626. Disponible en línea: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf010586o>. [Nov. 09, 2014].
- Pahune, P., A. Choudhari and P. Muley. 2013. The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects. *J Clin Diagn Res.*, 7(6):991-995. Disponible en línea: <http://>

- www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23905087. [Nov. 09, 2014].
- Pesch, S., M. Bergmann and H. Bostedt. 2006. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology*, 66:307-313. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413936>. [Nov. 09, 2014].
- Prior, R., X. Wu and K. Schaich. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.*, 53(10):4290-4302. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15884874>. [Nov. 09, 2014].
- Restrepo, G., J. Duque and J. Montoya. 2012. Effect of two protocols of cryopreservation on fertilizing capacity of stallion (*Equus caballus*) semen. *Rev Fac Nac Agr.*, 65(2):6711-6718. Disponible en línea: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/36504>. [Nov. 09, 2014].
- Vasconcelos, A., M. Santana, A. Santos, M. Santero and M. Lagares. 2010. Metabolic evaluation of cooled equine spermatozoa. *Andrologia*, 42:106-111. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20384800>. [Nov. 09, 2014].
- Waheed, M., S. El-Bahr and A. Al-haider. 2013. Influence of seminal plasma antioxidants and osteopontin on fertility of the Arabian horse. *J Eq Vet Sci.*, 33:705-709. Disponible en línea: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080612008702>. [Nov. 09, 2014].
- Wang, C., C. Chu, K. Chu, K. Choy, K. Khaw, M. Rogers and C. Panq. 2004. Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clin Chem.*, 50(5):952-954. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15105359>. [Nov. 09, 2014].
- Warren, L. 2009. Feeding the stallion. Pub. Alberta Agriculture and Rural Development, Alberta, USA. 4 p. Disponible en línea: [http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/agdex9622/\\$FILE/feeding-the-stallion.pdf](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/agdex9622/$FILE/feeding-the-stallion.pdf). [Nov. 09, 2014].
- Wnuk, M., B. Lewinska, G. Oklejewicz, M. Bartosz, M. Tischner and M. Bugno-Poniewierska. 2010. Redox status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude of DNA damage in sperm cells. *Theriogenology*, 74(9):1677-1684. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20728929>. [Nov. 09, 2014].
- Yadav, S., A. Suryakar, A. Huddedar, P. Durgawale and P. Shukla. 2006. Antioxidant treatment a new therapeutic approach to reversible male infertility. *Biomedical Research*, 17(3):175-178. Disponible en línea: http://www.researchgate.net/publication/255666584_Antioxidant_treatment_a_new_therapeutic_approach_to_reversible_male_infertility. [Nov. 09, 2014].