

**AUMENTO DE LA FERTILIDAD MEDIANTE TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO
AVANZADO DE SEMEN: CASO CLÍNICO**
**INCREASED FERTILITY THROUGHOUT ADVANCED SEMEN PROCESSING
TECHNIQUES: CASE REPORT**

Ayuso-Hernando, M; Gutierrez-Cepeda, L; Villalva, M; Serres, C.

Servicio de Reproducción, Hospital Clínico Veterinario Complutense. Facultad de Veterinaria
de la Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Correspondencia del autor: mayher@live.com

RESUMEN

La clínica reproductiva equina actual persigue mejorar la calidad seminal de sementales subfértiles, (la cual, además, se ve afectada por el procesamiento del semen) y que ésta se conserve durante el almacenamiento.

El objetivo de este trabajo es presentar un caso clínico remitido al Hospital Clínico Veterinario Complutense, sobre un semental que presenta una baja calidad seminal, siendo la fertilidad del primer lote de yeguas del 0%.

Ante estos resultados se decide realizar un procesado del semen, desarrollado por nuestro laboratorio, enfocado a aumentar su calidad mediante un protocolo de centrifugación coloidal con EquiPure® (Nidacon International AB).

La aplicación de este protocolo consigue aumentar la calidad seminal y mantenerla durante la conservación en refrigeración, obteniéndose unos resultados de fertilidad total del 57,1%, lo que lo valida como método efectivo para el procesado del semen en casos de sementales subfértiles.

Palabras clave: semen, equino, semental subfértil, centrifugación coloidal, EquiPure®.

ABSTRACT

Current equine reproductive clinic aims to improve subfertile stallions semen quality, (which is furthermore affected by the processing protocol) and maintain this quality during storage.

The aim of this paper is to present a case referred to the Hospital Clínico Veterinario Complutense, of a stallion with low sperm quality, and 0% fertility rate in the first batch of mares served.

Due to these results it was decided to perform a special semen processing protocol, developed by our laboratory, in order to increase its quality throughout a colloidal centrifugation technique with EquiPure®

This system is able to increase semen quality and maintain it during cooling preservation, obtaining results of around 57,1% of total fertility, which validates this technique as an effective method for subfertile stallions semen processing.

Keywords: semen, equine, subfertile stallion, colloidal centrifugation, EquiPure®,

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la inseminación artificial ha aportado grandes ventajas a la reproducción animal, permitiendo el máximo aprovechamiento del potencial genético de sementales de alta calidad, mejorando el control sanitario, evitando posibles daños durante la monta o el transporte de animales e incluso mejorando los resultados de fertilidad en casos de yeguas subfértiles.

La inseminación artificial se puede realizar mediante semen fresco, refrigerado o congelado. El semen equino es muy sensible a la manipulación y a los procesos de conservación, esto es debido a que durante el procesamiento y almacenamiento, los espermatozoides sufren estrés oxidativo, estrés osmótico (Ball, 2008) y cambios característicos de apoptosis (Brum *et al.*, 2008), como la activación de caspasas o desórdenes en los lípidos de la membrana plasmática como la exteriorización de la fosfatidilserina (Thomas *et al.*, 2006), disminuyendo la calidad del semen (Ball, 2008).

Sin embargo, estos cambios no son iguales en todos los sementales, de modo que existe una gran variabilidad individual en cuanto a la tolerancia del semen a la manipulación y la refrigeración; esto se traduce en que un tercio de los sementales no soportan el proceso de refrigeración (Allen, 2005).

En el caso de la congelación, se considera que sólo el 30% de sementales tienen una

buena capacidad de congelación, independientemente de su fertilidad en monta natural (Brinsko *et al.*, 2000; Loomis y Graham, 2008).

Además, si se trata de caballos de Pura Raza Española, cabe destacar la baja calidad seminal del semen fresco (Benito *et al.*, 2003), partiendo de un número limitado de ejemplares que superan el 50% de motilidad progresiva, lo que empeora los resultados obtenidos tras el procesamiento del semen.

Debido a todo lo señalado anteriormente, en la clínica actual se tiende a mejorar la calidad del semen mediante varias técnicas y a conseguir que ésta se mantenga durante el almacenamiento, ya sea en refrigeración o en congelación (Johannisson *et al.*, 2009).

Algunas de las técnicas empleadas con este fin son: la separación del plasma seminal (Brinsko *et al.*, 2000; Loomis, 2006; Aurich, 2008), los colchones de centrifugación (Ecot *et al.*, 2005; Waite *et al.*, 2008) y las técnicas de selección de espermatozoides, las cuales tienen como resultado la obtención de un menor número de espermatozoides que la muestra inicial pero con mejores características, por ejemplo, la migración espermática (con la que se obtienen espermatozoides con mayor motilidad), la filtración (se mejora la integridad de la membrana) y la centrifugación coloidal (cuyo resultado es una mayor motilidad, mayor proporción de espermatozoides morfológicamente normales, con buena estabilidad de membrana e integridad de la cromatina) (Morrell *et al.*, 2009a; Morrell *et al.*, 2009b), y menor proporción de espermatozoides con cambios apoptóticos (los cuales están relacionados con infertilidad en otras especies) (Brum *et al.*, 2008).

Esta centrifugación coloidal puede dividirse a su vez en centrifugación en una única capa y centrifugación con gradientes de densidad (Morrell *et al.*, 2008).

Los sistemas de centrifugación por gradientes de densidad (EquiPure®) presentan dos importantes desventajas, la primera es que su preparación es lenta y complicada (existiendo una alta probabilidad de que los dos componentes se mezclen); además, los componentes son costosos, lo que encarece el procesamiento del semen. Esto es debido a que están desarrollados para la centrifugación de pequeños volúmenes de semen utilizados en las técnicas de fecundación *in vitro* (Macpherson *et al.*, 2002; Varner *et al.*, 2008). Por ello, se han desarrollado diferentes protocolos utilizando un solo gradiente, lo que simplifica y abarata el proceso, con unos resultados similares al uso de dos gradientes (Gutiérrez-Cepeda *et al.*, 2011).

Además de su función como medio de selección de espermatozoides, la centrifugación mediante gradientes (EquiPure®) ha demostrado ser también efectiva a la hora de eliminar agentes patógenos del semen (Johannisson *et al.*, 2009; Morrell, 2009).

El objetivo de este trabajo es presentar la aplicación clínica de un nuevo protocolo simple y económico del método EquiPure®.

CASO CLÍNICO

Presentación del caso:

Durante la temporada de reproducción 2010, ingresa en el HCVC (Hospital Clínico Veterinario Complutense) un semental P.R.E. (Pura Raza Español) de gran valor genético con una lesión que requiere un periodo de rehabilitación; dicha patología le impide además que desarrolle una actividad normal como reproductor, en monta natural.

El propietario no cuenta en su yeguada con las instalaciones necesarias para poder tener un manejo adecuado de inseminación artificial durante la recuperación, por lo que decide acudir al HCVC, el cual le ofrece los medios para realizar una correcta rehabilitación y para evitar un agravamiento de la lesión, realizando extracciones de semen sobre un fantasma a baja altura con un bajo ritmo de recogida.

Evaluación seminal:

Durante los primeros días se entrena al caballo para que salte en el fantasma y se realiza una primera evaluación seminal.

Tras la recogida de semen, se filtra para retirar la fracción de gel del eyaculado, se mide el volumen y se determina la concentración espermática en un fotómetro (SpermaCue®). La motilidad total (MT) y progresiva (MP) se evalúa en un microscopio óptico con pletina calefactora, en una muestra de semen diluido 1:1 en INRA 96® (IMV; France), esta medición se realiza siempre por la misma persona.

Los resultados de motilidad obtenidos son muy malos (25% de MP), achacables posiblemente a un largo periodo de reposo reproductivo, por lo que se realizan extracciones hasta agotar las reservas espermáticas. El resto de los parámetros analizados se encuentran dentro del rango fisiológico.

Una vez agotadas estas reservas, la calidad seminal se estabiliza presentando eyaculados que no superan en ningún momento el 40% de MP. Aun en estas circunstancias desfavorables el propietario decide inseminar sus propias yeguas mediante inseminación artificial con semen refrigerado.

Procesamiento seminal:

Comenzamos con un sistema de refrigeración tradicional centrifugando el semen en INRA 96® a 450g durante 7 minutos para retirar el plasma seminal, el semen se envía a la

propia yeguada con un margen entre la recogida y la inseminación menor a 16 horas, la motilidad observada por el veterinario de la yeguada no supera en ningún caso el 20% de MP.

Se realiza una sola inseminación en las yeguas 24 horas después de inducir la ovulación con hCG (Gonadotropina Coriónica humana). El diagnóstico de gestación se realiza mediante ecografía a los 15 días postovulación, obteniendo una fertilidad del 0% en el primer lote de 3 yeguas.

Debido a estos resultados, se decide probar para el procesamiento del semen una técnica de purificación basada en la separación de los espermatozoides mediante gradientes de densidad.

Esta técnica, en concreto el sistema EquiPure[®], consta de dos coloides con distinta densidad, Bottom Layer[®], con una densidad de 80% y Top Layer[®], con 40% de densidad, que permite la separación de los espermatozoides en función de sus puntos isopícnicos (se sitúan en el gradiente que tenga su misma densidad) de modo que los espermatozoides con anomalías morfológicas o con menor motilidad, permanecen en las capas superiores, mientras que los morfológicamente normales y los de mejor motilidad, descienden más fácil y rápidamente a través de los coloides formando un pellet en el fondo (Edmond *et al.*, 2008). Con este sistema se han obtenido buenos resultados (Stoll *et al.*, 2008; Sudderth *et al.*, 2010; Mari *et al.*, 2010; Macpherson *et al.*, 2002; Varner *et al.*, 2008; Edmond *et al.*, 2008) tanto a las 3 horas de la centrifugación como a las 24 y 48 horas (manteniendo la muestra en refrigeración a 5°C) encontrándose diferencias significativas con las muestras no sometidas a esta técnica (Johannisson *et al.*, 2009).

El protocolo original, recomendado por la casa comercial de este producto, establece las siguientes cantidades de ambas capas de coloides para un volumen de semen determinado (Tabla 1)

Volumen eyaculado	Tamaño del tubo (ml)	Volumen Bottom layer (ml)	Volumen Top layer (ml)	Volumen de semen por tubo (ml)
Pequeño	10-15	2	2	2-3
Mediano	50-60	5	5	4-6
Grande	50-60	10	10	7-10

Tabla 1: Protocolos recomendados por Nidacon International AB

Sin embargo, debido al importante gasto que este protocolo conlleva y a su complejidad técnica, en el HCVC, desarrollamos un nuevo protocolo, utilizando menores cantidades de coloides.

Se preparan en un tubo de centrifugación de 50 ml, los dos componentes de EquiPure®, en dos capas, 5 ml de Bottom Layer® y sobre él 5 ml de Top Layer®. Esta maniobra debe hacerse con mucho cuidado para evitar que los dos componentes se mezclen, lo que daría como resultado una sola fase con una densidad intermedia, lo que inutilizaría el gradiente. Una vez se han colocado los dos componentes, se añade resbalando por las paredes del tubo y despacio para evitar que se rompa la interfase, 10 ml de semen (previamente diluido 1:1 con INRA 96®), de modo que al final queden en el tubo de centrifuga, tres capas diferenciadas (Figura 2). Finalmente, se centrifuga durante 20 minutos a 300g.

Una vez centrifugado, se observa en el fondo del tubo un pellet (formado por los espermatozoides con mejor motilidad, morfología y menores índices de fragmentación de DNA), que han atravesado los coloides para llegar hasta el fondo (Figura 1). Con la ayuda de una pipeta, se separan los coloides del pellet y éste se resuspende y se diluye hasta la concentración de 50×10^6 espermatozoides móviles progresivos (EMP) por mililitro.

Fig. 1

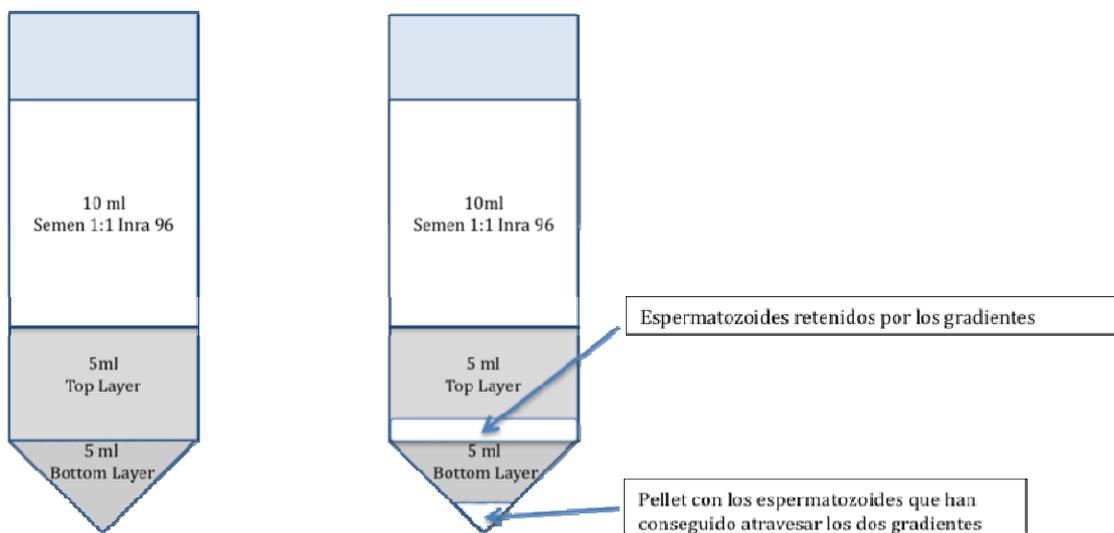


Figura 1: esquema de las capas observadas antes (izqda) y después (dcha) de la centrifugación

Tras la centrifugación, evaluamos el semen mediante el sistema computerizado Proyser®, encontrando una mejora de la motilidad progresiva tanto en fresco (del 40% al 61,1%) como a las 24 horas tras el almacenamiento en refrigeración a 5°C (un 20% observado en muestras sin este tratamiento frente al 59,9% en las dosis procesadas con este sistema) (Figura 2a y 2b).

Fig. 2a:

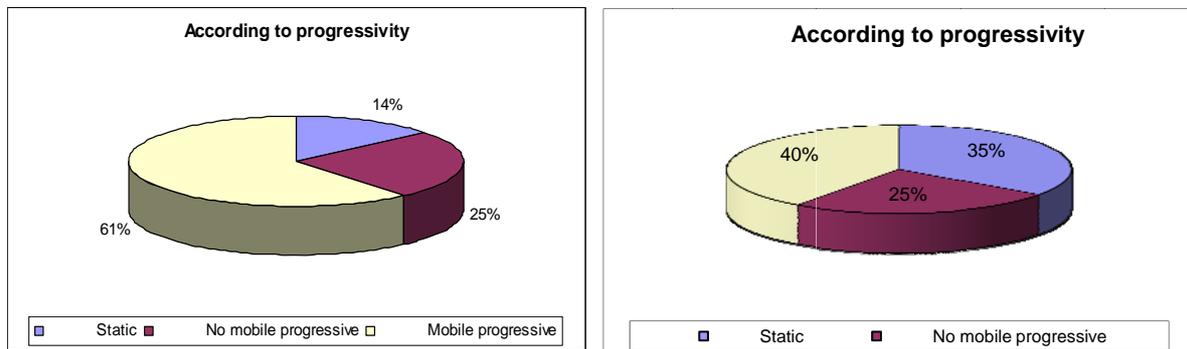


Figura 2a: Representación gráfica de la motilidad del semen fresco sin tratar (arriba) y tras centrifugación con EquiPure® (abajo).

Fig. 2b:

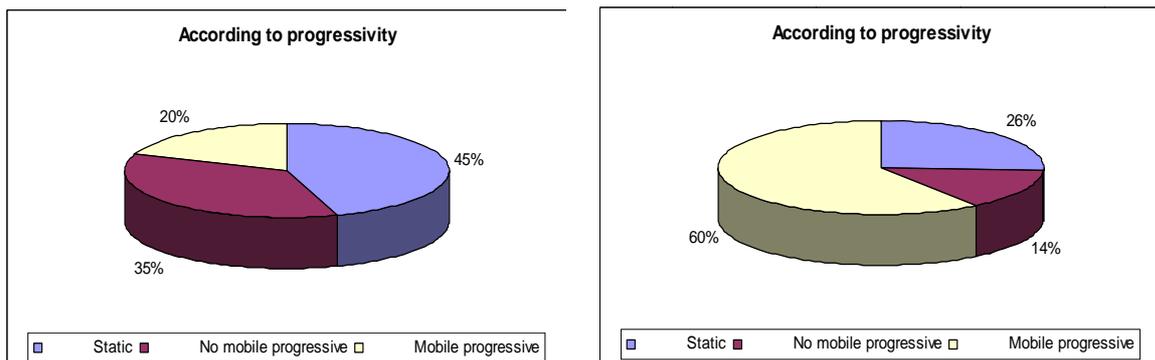


Figura 2b: Representación gráfica de la motilidad del semen tras 24 horas de almacenamiento a 5°C. Muestra sin tratar (arriba) y muestra centrifugada con EquiPure® (abajo).

Debido a los resultados obtenidos en esta prueba, se comienza un protocolo de trabajo, de dos o tres extracciones semanales, preparación de semen con el sistema EquiPure®, dilución en INRA 96® y posterior preparación de dosis con 1000×10^6 de espermatozoides móviles progresivos. Las dosis se mantienen en refrigeración a 5°C en cajas isotérmicas que contienen acumuladores de frío en su interior y son enviadas en un plazo máximo de 6 horas tras la extracción. Así mismo, esta mejora en los parámetros de los espermogramas tras la centrifugación con EquiPure®, nos permite poner dosis seminales a la venta.

Resultados obtenidos:

Durante la estancia del caballo en el HCVC se le realizan un total de 40 extracciones, obteniéndose los siguientes valores medios tras la evaluación del semen (Tabla 2).

Tabla 2

Extracciones	Volumen (ml)	Concentración (millones/ml)	Nº total spz($\times 10^6$)	MT (%)	MP (%)	EMP ($\times 10^6$)
40	61,3	142	8713	60	40	3775

Tabla 2: Valores medios obtenidos en la evaluación seminal de los distintos eyaculados del semental

En total, son inseminadas 35 yeguas; utilizándose un número total de 54 ciclos, obteniendo una fertilidad por ciclo (FC) del 37% (20/54) y una fertilidad total (FT) del 57,1% (20/35) (Figura 4).

FC= nº de gestaciones/nº de ciclos inseminados

FT= nº de gestaciones/nº de yeguas inseminadas

Fig. 3

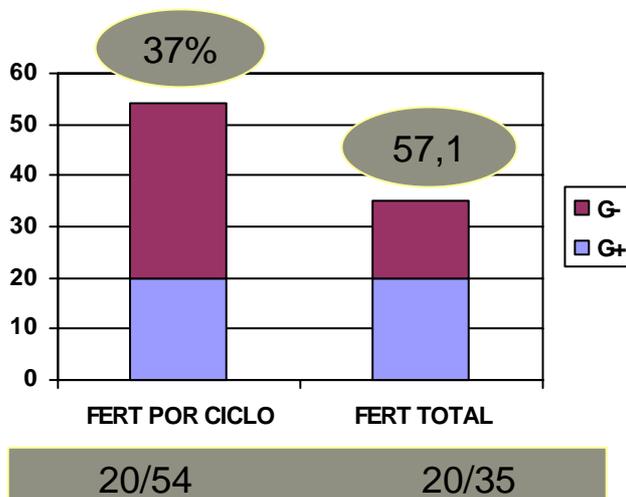


Figura 3: Fertilidad obtenida

DISCUSIÓN

La elección de los sementales en la especie equina se realiza en función de su valor genético, no en función de su calidad espermática (Varner *et al.*, 2008), es por ello que es frecuente encontrarse con sementales muy valiosos y demandados que son subfértiles.

Los medios desarrollados hasta ahora para mejorar la calidad seminal en individuos subfértiles eran difícilmente aplicables a la clínica reproductiva equina; sin embargo, los estudios actuales buscan conseguir protocolos con buenos resultados pero disminuyendo los costes y el tiempo de procesamiento para hacerlos más asequibles.

El objetivo de las nuevas técnicas de procesamiento es conseguir una población espermática con buenos parámetros de calidad, eliminando los espermatozoides dañados o muertos, que pueden dañar al resto de células debido a los procesos de degradación, disminuyendo su viabilidad (Johannisson *et al.*, 2009). Con esto se consigue no sólo mejorar la calidad del eyaculado, sino mantener dicha calidad durante el periodo de conservación (Morrell *et al.*, 2008; Johannisson *et al.*, 2009; Morrell *et al.*, 2009a; Morrell *et al.*, 2009b).

En nuestro caso, el único parámetro de calidad estudiado fue la motilidad progresiva, encontrando tras la centrifugación con EquiPure[®], un aumento importante (del 20%-40% en fresco al 61% tras la centrifugación), que además se mantuvo durante el almacenamiento a 5°C (del 20% sin tratamiento al 59,9% con este procesado a las 24h). De acuerdo con nuestros resultados, otros autores han descrito que el uso de gradientes de densidad mejora la motilidad (Macpherson *et al.*, 2002; Morrell *et al.*, 2008; Stoll *et al.*, 2008; Johannisson *et al.*, 2009; Morrell *et al.*, 2009a; Morrell *et al.*, 2009b; Morrell *et al.*, 2010) y la mantiene durante la refrigeración (Johannisson *et al.*, 2009), además de observar una menor fragmentación del DNA (Brum *et al.*, 2008; Johannisson *et al.*, 2009) y una mayor estabilidad de la membrana plasmática (Stoll *et al.*, 2008; Morrell *et al.*, 2009a; Morrell *et al.*, 2009b).

Aunque hay estudios donde las tasas de fertilidad no mejoran cuando se usa semen en procesado con diferentes métodos de selección espermática; como el estudio en el que tras la inseminación intrauterina profunda con semen procesado mediante filtración con sephadex y SLC (centrifugación en una única capa) con Percoll (Nie *et al.*, 2003) no encontraron diferencias significativas; y los estudios publicados en 2002 realizados sobre muestras refrigeradas (Alvarenga y Leao, 2002) y muestras procedentes de epidídimo (Morris *et al.*, 2002) centrifugadas mediante gradientes de densidad para eliminar espermatozoides anormales o dañados por el proceso de conservación, donde tampoco encontraron diferencias significativas en cuanto a la fertilidad.

Hay otros estudios que como en el nuestro encuentran un aumento de la fertilidad; Varner y colaboradores en 2008 obtienen una tasa de fertilidad (combinando DGC (centrifugación con gradientes de densidad) con inseminación por histeroscopia) del 75%, comparado con un 38% de fertilidad tras centrifugación con colchón, mientras que Mari y colaboradores en 2010 obtienen resultados usando inseminación intrauterina profunda junto con centrifugación con gradientes de densidad del 62% por ciclo (con dosis de 130×10^6 espermatozoides) frente al 43% por ciclo logrado tras centrifugación simple (dosis de 500×10^6 espermatozoides).

Estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo donde los resultados de fertilidad han aumentado en 57 puntos (0% vs. 57%).

En nuestro caso no sólo hemos conseguido que un ganadero (que en otras circunstancias hubiera tenido que perder la temporada reproductiva) pueda tener potros de un semental de alta calidad genética, sino que además el coste económico que suponía la estancia del caballo fuera de la yeguada, la rehabilitación y el manejo seminal con productos de alto coste, ha sido del todo amortizado gracias a la venta de dosis a otros ganaderos.

Como conclusión, podemos señalar que la centrifugación de grandes volúmenes de semen equino mediante gradientes de densidad permite incrementar la calidad seminal y la resistencia a la conservación en refrigeración a 5°C, aumentando la fertilidad de sementales subfértiles.

Dentro de las perspectivas futuras se encuentran la combinación de la centrifugación coloidal (utilizando una sola capa) (Gutiérrez-Cepeda, 2011), con técnicas de inseminación intrauterina profunda que podría mejorar los resultados de fertilidad, con un coste de procesamiento asequible.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, WR. 2005. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction in Domestic Animals*, 40(4), 310-329.
- Alvarenga, MA. y Leao, KM. 2002. Hysteroscopic insemination of mares with low number of frozen thawed spermatozoa selected by percoll gradient. *Theriogenology*, 58(2-4), 651-653.
- Aurich, C. 2008. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), 268-275.
- Ball, BA. 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and

- preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), 257-267.
- Benito, D., Alvarez, A., Crespo, F., Mateos, E., Gómez-Cuétara, C. y Serres, C. 2003. Análisis computerizado del sem en de caba llo de Pura Raza Española. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Las Palmas, España.
- Brinsko, SP., Crockett, EC. y Squires, EL. 2000. Effect of cen trifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, 54(1), 129-136.
- Brum, AM., Sabeur, K. y Ball, B A. 2008. Apopt otic-like changes in equine sperm atozoa separated by density-gradient cen trifugation or after cryopreservation. *Theriogenology*, 69(9), 1041-1055.
- Ecot, P., Decuadro-Hansen, G., Delhomme, G. y Vidament, M. 2005. Evaluation of a cushioned centrifugation technique fo r processing equine sem en for freezing. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4), 245-248.
- Edmond, AJ., Teague, SR., Brinsko, SP., Com erford, KL., Waite, JA., Mancill, SS. y col. 2008. Effect of density-gradien t centrifugation on quality and recovery rate of equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4). DOI10.1016/j.anireprosci.2008.05.095|16.
- Gutierrez-Cepeda, L., Fernandez, A., Crespo, F., Gosalvez, J. y Serres, C. 2011. Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. *Animal Reproduction Science*, 124(1-2), 85-89.
- Johannisson, A., Morrell, JM., Thoren, J., Jon sson, M., Dalin, AM. y Rodriguez-Martinez, H. 2009. Colloidal centrifugation with androcol I-E (TM) pro longs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science*, 116(1-2), 119-128.
- Loomis, PR. 2006. Advanced m ethods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, 22(3), 663-+.
- Loomis, PR. y Graham, JK. 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, 105(1-2), 119-128.
- Macpherson, ML., Blanchard, TL., Love, CC., Brinsko, SP. y Varner, DD. 2002. Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallions. *Theriogenology*, 58(2-4), 317-320.
- Mari, G., Castagnetti, C., Morganti, M., Rizzato, G., Mislei, B., Iacono, E. y Merlo, B. 2010. Comparison of density gradient and simple centrifugation of equine spermatozoa: Effect on fertility of an oligosperm ic-subfertile stallion. *Animal Reproduction Science*, 121(1-2,

- Supplement 1), 153-154.
- Morrell, JM. 2009. Prevention of pathogen transmission through breeding in horses. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 72-72.
- Morrell, JM., Dalin, AM. y Rodriguez-Martinez, H. 2008. Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: A preliminary study. *Animal Reproduction*, 5(3-4), 121-126.
- Morrell, JM., Dalin, AM. y Rodriguez-Martinez, H. (2009a). Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: Yield, motility and survival. *Equine Veterinary Journal*, 41(1), 53-58.
- Morrell, JM., Johannisson, A., Dalin, AM. y Rodriguez-Martinez, H. (2009b). Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single layer centrifugation through silica colloids. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3), 512-517.
- Morrell, JM., Johannisson, A., Juntilla, L., Rytty, K., Backgren, L., Dalin, AM. y col. 2010. Stallion sperm viability, as measured by the nucleocounter SP-100, is affected by extender and enhanced by single layer centrifugation. *Veterinary Medicine International*, 2010, 659862.
- Morris, L., Tiplady, C. y Allen, WR. 2002. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*, 58(2-4), 643-646.
- Nie, GJ., Johnson, KE. y Wenzel, JGW. 2003. Pregnancy outcome in mares following insemination deep in the uterine horn with low numbers of sperm selected by glass wool/Sephadex filtration, percoll separation or absolute number. *Animal Reproduction Science*, 79(1-2), 103-109.
- Stoll, A., Stewart, BL., Brum, AM., Liu, IK. y Ball, BA. 2008. Evaluation of cryopreserved-thawed stallion sperm before and after density gradient centrifugation with silane-coated silica particles (EquiPure®). *Theriogenology*, 70(3), 590-591.
- Sudderth, AK., Das, PJ., Varner, DD. y Raudsepp, T. 2010. Determination of optimal semen processing methods for total RNA isolation and sperm genomic analysis. *Animal Reproduction Science*, 121(1-2, Supplement 1), 149-150.
- Thomas, AD., Meyers, SA. y Ball, BA. 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, 65(8), 1531-1550.
- Varner, DD., Love, CC., Brinsko, SP., Blanchard, TL., Hartman, DL., Bliss, SB. y col. 2008. Semen processing for the subfertile stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(11), 677-685.

Waite, JA., Love, CC., Brinsko, SP., Teague, SR ., Salazar, JL., Mancill, SS. y Varner, DD. 2008. "Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation"; *Theriogenology*, vol70, issue4, pages 704-714, Sept 2008.