

**ASPECTOS GENERALES DEL PROCESO DE
CONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO: UNA REVISIÓN
DESDE LA CONGELACIÓN ESPERMÁTICA**





ASPECTOS GENERALES DEL PROCESO DE CONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO: UNA REVISIÓN DESDE LA CONGELACIÓN ESPERMÁTICA CIENCIAS VETERINARIAS



GENERALITIES OF THE PROCESS OF EQUINE SPERM CONSERVATION: A REVIEW FROM THE SPERM FREEZING VETERINARY SCIENCES

GENERALIDADES DE PROCESSO DE CONSERVAÇÃO DE ESPERMA EQUINO: UMA REVISÃO A PARTIR DO CONGELAMENTO DE ESPERMA CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CASTRO CRUZ, Jefferson Abdelo¹

CHACÓN JARAMILLO, Liliana²

¹M.V.Z., M.Sc.

Fundación Universitaria Juan de Castellanos

Correspondencia: jcastro@jdc.edu.co

²M.V., M.Sc., Ph.D.

Universidad de La Salle

Correspondencia: lchacon@unisalle.edu.co

Recibido: 15/07/2015

Aceptado: 22/04/2016

RESUMEN

La congelación del semen permite conservar y almacenar material genético por largos periodos de tiempo. La inseminación artificial con semen congelado, es una herramienta importante en la utilización de sementales de genética superior; uno de los problemas del semen equino son los eyaculados con baja motilidad y alto porcentaje de espermatozoides con anomalías;



de igual manera, se observan diferencias en la calidad del eyaculado entre individuos, razón por la cual, solo un bajo porcentaje de sementales responden bien a la congelación. Las principales causas de la pobre respuesta a la congelación son: el crioprotector empleado, la permeabilidad de la membrana espermática, la carga microbiológica en el eyaculado, factores genéticos y otros factores que no son claros y se continúan investigando. Durante el proceso de congelación, el espermatozoide se ve expuesto a variaciones en temperatura y osmolaridad, lo cual trae como consecuencia la formación de cristales de hielo, provocando alteraciones en la motilidad y viabilidad. Las dos principales causas de disminución en la calidad seminal, en procesos de congelación, son el daño en la estructura de membrana y el estrés osmótico, lo cual ocasiona incremento en la permeabilidad de la membrana y con ello entrada de agua, iones y crioprotectores. Los porcentajes de preñez varían entre 30 y 70 %, los resultados dependen principalmente de la respuesta del eyaculado a la congelación. Esta revisión tiene como objetivo reconocer los diferentes factores fisiológicos, técnicas de congelación y tendencias de investigación, con el propósito de mejorar los resultados en el proceso de conservación seminal.

Palabras clave: Caballo, criopreservación, crioprotector, descongelación de semen.

ABSTRACT

Sperm freezing allows preserving and storing genetic material for long periods of time. Artificial insemination with frozen sperm is an important tool in the use of genetic quality stallions; one of the problems of equine sperm are the ejaculated with low motility and high percentage of spermatozooids with abnormalities; similarly, differences in quality of the ejaculated between individuals observed, which is why only a low percentage of stallions respond well to freezing. The main causes of the poor response to freezing are: the cryoprotectant used, the permeability of the spermatic membrane, the microbiological load in the ejaculate, genetic factors and other factors that are unclear and are still under research. During the freezing process, the sperm is exposed to variations in temperature and osmolarity, which results in the formation of ice crystals, causing changes in motility and viability. The two main causes of decrease in sperm quality in freezing processes are damage to the membrane structure and osmotic stress, resulting in increased membrane permeability and thus water inlet, ions and cryoprotectant. Pregnancy rates vary between 30 and 70%, the results depend mainly on the response of the ejaculated to freeze. This review aims to recognize the different physiological factors, freezing techniques and research trends, in order to improve results in the process of seminal conservation.

Key words: Horse, cryopreservation, cryoprotectant, thawing sperm.



RESUMO

Congelamento do sêmen permite preservar e armazenar o material genético por longos períodos de tempo. A inseminação artificial com sêmen congelado é uma ferramenta importante no uso de ganhos de maior genética; um dos problemas de esperma equino é os ejaculados com baixa motilidade e alta porcentagem de espermatozoides com anormalidades; Da mesma forma, Observam-se diferenças na qualidade do ejaculado entre indivíduos, é por isso que apenas umas pequenas porcentagens de ganhos respondem bem ao congelamento. As principais causas da fraca resposta ao congelamento são: o crioprotetor utilizado, a permeabilidade da membrana espermática, a carga microbiana no ejaculado, fatores genéticos e outros fatores que não são claras e ainda estão investigando. Durante o processo de congelamento, o esperma é exposto a variações na temperatura e na osmolaridade, o que resulta na formação de cristais de gelo, causando alterações na motilidade e viabilidade. As duas principais causas de redução da qualidade do esperma em processos de congelamento são dano na estrutura da membrana e o stress osmótico, resultando num aumento da permeabilidade da membrana e, portanto, entrada de água, íons e agentes crioprotectores. As taxas de gravidez variam entre 30 e 70%, os resultados dependem, principalmente, da resposta do ejaculado a congelamento. Esta avaliação destina-se a reconhecer os diferentes fatores fisiológicos, técnicas de congelamento e tendências de pesquisa, a fim de melhorar os resultados no processo de conservação seminal.

Palavras-chave: Cavallo, criopreservação, crioprotetor, descongelación de sêmen.

INTRODUCCIÓN

La congelación del semen equino permite conservar material genético de animales de alto valor, e incrementar el número de hembras servidas por eyaculado (Davies & Mina, 2003), además de prevenir el riesgo de transmisión de enfermedades venéreas (Loomis & Graham, 2008), minimizando la posibilidad de llegada de bacterias al útero potencialmente presentes durante la monta y causantes de endometritis, dado que el diluyente contiene antibiótico (Clement, 1993).

El éxito en la congelación del semen equino, es menor que en otras especies domésticas

(Blottner *et al.*, 2001); sin embargo, persiste el interés de las asociaciones de criadores, dada la facilidad de disponer del semen en cualquier momento (Albrizido *et al.*, 2015). La subfertilidad es un problema de importancia en el caballo (Kenney *et al.*, 1995), y un reto cuando se pretende conservar y potencializar su uso en animales que revisten alto valor genético dentro de su raza, una de las causas de esta infertilidad es la presencia de espermatozoides con baja motilidad y alto porcentaje de anormalidades (Pickett *et al.*, 1989).



Existen diferencias individuales, solo pocos equinos responden favorablemente al proceso de congelación (Barbas & Mascarenhas, 2009). El 20 % de los sementales responden bien a la congelación (Tischner, 1979), el 60 % lo hacen de una manera aceptable y un 20 % son deficientes (Sieme *et al.*, 2008; Kuisma *et al.*, 2006) y los porcentajes de preñez varían entre 19 y 84 % (Barrier *et al.*, 2016). Las posibles causas contribuyentes a estas diferencias en el éxito de congelación, incluyen: el tipo de crioprotector utilizado (Alvarenga *et al.*, 2005); la carga microbiológica en el eyaculado (Guimarães *et al.*, 2015; Aurich & Spersger, 2007); factores genéticos (Allen, 2005), como por ejemplo, en Brasil se evidenció que el semen de caballos Mangalarga Manchador es más susceptible a daños en la congelación en comparación con caballos de salto (Alvarenga *et al.*, 2000); y otros factores que no están claros (Sieme *et al.*, 2008).

Adicionalmente, existe una gran variabilidad entre los laboratorios que procesan el semen y lo someten a procesos de congelación (Samper & Morris, 1998), que repercute en mayores diferencias en el éxito en las tasas de preñez cuando se utiliza el semen congelado-descongelado para inseminar las yeguas. Los protocolos para el uso comercial de semen equino congelado-descongelado en la inseminación artificial (IA) en yeguas, recomiendan depositar de 250×10^6 a 500×10^6 espermatozoides móviles (Householder *et al.*, 1981) congelados en pajillas de 0.25 a 0.5 mL en concentraciones que van de 100×10^6 a 500×10^6 mL (Heitland *et al.*, 1996; Wockener & Schubert, 1993; Cochran *et al.*, 1983), más recientemente se emplea una dosis total 800×10^6 en pajillas de 0,5 mL a una concentración de 200×10^6

de espermatozoides por mL (Ribeiro *et al.*, 2015).

Sin embargo, con el uso de nuevas tecnologías como el semen sexado, estos protocolos de congelación requieren refinamiento para hacer frente a la reducción del número de espermatozoides disponibles en cada dosis de inseminación y los efectos perjudiciales durante el procesamiento prolongado (Johnson & Welch, 1999). Los protocolos para la congelación de espermatozoides equinos sexados utilizan pajillas de 0.25 mL con concentraciones de espermatozoides que van desde 20×10^6 hasta 90×10^6 mL (Lindsey *et al.*, 2003; Lindsey *et al.*, 2002). Esta revisión tiene como objetivo reconocer los diferentes factores fisiológicos, técnicas de congelación y tendencias de investigación, con el propósito de mejorar los resultados en el proceso de conservación seminal.

Evaluación de semen fresco

Una vez colectado el eyaculado, se procede a su filtración para la separación del gel y posterior evaluación de las características macro y microscópicas del semen (motilidad, morfología, concentración, bacteriología), en donde todos los equipos y materiales de laboratorio que entren en contacto con el semen deben estar a 37 °C (de Geoffroy, 2015). Se recomienda, antes de iniciar el proceso de congelación, que el semen en fresco, mínimo, presente una morfología de espermatozoides normales por encima del 40 %, una motilidad progresiva mayor al 60 % y una concentración superior a 100 millones de espermatozoides por mL (Restrepo *et al.*, 2014; Fayer-Hosken *et al.*, 2008), aunque si es necesario también se han desarrollado algunos protocolos especiales para procesar eyaculados de bajo volumen y concentración (Barrier-Battut, 2013).



Dilución, centrifugación seminal y congelación

Posterior a la evaluación macroscópica, se procede a realizar la primera dilución del semen, generalmente se realiza 1:1 (semen: diluyente, v/v). Los diluyentes más utilizados en equinos son el Kenney (Kenney *et al.*, 1975) y el INRA96®, los cuales permiten mantener el semen mientras se transporta, luego se centrifuga y se le adicionan las sustancias criopreservantes para iniciar el proceso de congelación. En el caso del uso del diluyente comercial INRA 96®, se realiza una primera dilución del semen, esta dependerá también de la concentración de espermatozoides, mínimo se debe usar una parte de semen por tres de diluyente (Pillet *et al.*, 2008). Si el eyaculado es de baja concentración (<166 millones de espermatozoides por mL), se adiciona máximo 15 mL de semen hasta completar una mezcla 45 mL de eyaculado más INRA 96®; si el eyaculado es altamente concentrado, no se debe exceder en 2500 millones de espermatozoides en la misma mezcla de 45 mL.

Posteriormente, se procede a realizar la evaluación microscópica debiéndose encontrar una motilidad progresiva superior a 50 %, a continuación se lleva el semen diluido a una temperatura de 20 °C por 10 minutos (de Geoffroy, 2015; Pillet *et al.*, 2008). El semen se somete a centrifugación de 400 a 600 gaus (g) durante 10 minutos, con el fin de eliminar el plasma seminal y obtener un precipitado que permita contar y diluir nuevamente con el diluyente (100 millones por mL) que contiene los crioprotectores (glicerol o amidas). El semen se mantiene refrigerado a 5 °C por 75 minutos, se empaqueta en las pajillas que permiten llevarlo a los vapores de nitrógeno y conservarlo hasta su futura utilización (de Geoffroy 2015; Pillet *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 1978).

La centrifugación del semen, aunque permite concentrar los espermatozoides, puede producir en ellos un choque mecánico, que genera una pérdida aproximada al 10 % de los espermatozoides. No obstante, se considera la opción más económica, puesto que no se utiliza gradiente de concentración (Barrier-Battut, 2013). Independientemente de la técnica que se emplee, sea, filtración centrifugación simple, centrifugación, en coloides de silicato (Percoll) o por centrifugación con iodixanol, tanto en semen sexado como convencional, estos procesos afectan la integridad de la membrana acrosómica y la motilidad espermática (Mari *et al.*, 2015).

Algunos laboratorios recomiendan el uso de otra técnica de separación por centrifugación a 1000 g por 20 minutos con la utilización de un gradiente de concentración, el cual es una solución que contiene iodixanol (Sieme *et al.*, 2006; Ecot *et al.*, 2005). Esta centrifugación, se realiza en un medio isotónico, no iónico, no tóxico (Ford *et al.*, 1994), por lo tanto, al centrifugar los espermatozoides normales flotan y el paquete de espermatozoides anormales y no motiles se precipitan en el tubo de ensayo. Esta técnica facilita la recuperación de los espermatozoides en el sobrenadante, optimizando el número de espermatozoides aprovechables en comparación con la centrifugación descrita anteriormente, por lo que reduce el choque mecánico de los mismos en el fondo del tubo (Barrier-Battut, 2013; Waite *et al.*, 2008). El empleo de iodixanol también mejora la integridad de membrana y de la cromatina en el posterior proceso de congelación y descongelación (Stuhtmann *et al.*, 2012).

Se reporta también la concentración y separación de espermatozoides por medio del gradiente de centrifugación con Percoll[®], es una sustancia compuesta por silicatos. El semen se diluye a una concentración de 100 millones de espermatozoides por mL,



se centrifugan a 300 g por 20 minutos. Los espermatozoides normales se compactan y precipitan en el fondo del tubo, los espermatozoides anormales, residuos de diluyentes y bacterias, flotan en la parte superior del tubo sobre el coloide (de Geoffroy, 2015; Barrier-Battut, 2013). Esta técnica está indicada tanto para eyaculados de bajo volumen y concentración, como para eyaculados de alto volumen (Barrier-Battut, 2013).

Se puede mejorar la fertilidad mediante el empleo de gradientes de densidad discontinuos en la separación del eyaculado para mejorar la morfología y la motilidad progresiva (Varner *et al.*, 2008). Sin embargo, tienen como desventajas que se pierde un número importante de espermatozoides; adicionalmente, los espermatozoides se ponen en contacto con restos celulares de otros espermatozoides, permitiendo la activación de especies reactivas al oxígeno, que son tóxicas a los espermatozoides durante el proceso de enfriamiento e incluso en el tracto reproductivo de la hembra durante la fertilización (Morell *et al.*, 2012). Así mismo, los espermatozoides que sufren daño en la cromatina (no compensables) compiten con los espermatozoides normales por la fecundación y también afectan el desarrollo embrionario (Morell, 2012).

Posterior al proceso de centrifugación, se continúa con la dilución del semen en el medio-diluyente con el crioprotector (3 % - 6 % de glicerol o 5% dimetilformamida o metilformamida) (Alvarenga *et al.*, 2005; Loomis *et al.*, 1983), que permite la estabilización a 4 °C por dos horas. Finalmente, se realiza el proceso de congelación del sistema, llevando las pajillas a temperaturas desde 4° C hasta -196 °C dentro del nitrógeno líquido. Estas curvas de enfriamiento se pueden generar manualmente colocando las pajillas sobre vapores de nitrógeno líquido dentro de

una caja de icopor, o mediante equipos comerciales de congelación que controlan la curva (Planer Kryo 10, series III, Planer Products, Middlesex, UK). En sistema manual, las pajillas se colocan a tres o cuatro centímetros sobre los vapores de nitrógeno líquido dentro de una caja de Styrofoam® (42 cm × 28 cm × 12,5 cm) cubierta con una tapa durante 7 a 10 minutos antes de sumergirse en el nitrógeno líquido, y luego se almacenan en los termos de nitrógeno líquido (de Geoffroy, 2015; Clulow *et al.*, 2008). La curva de congelación para el equipo (Kryo 10-3.3; Messer Griesheim, Germany) tiene dos rangos diferentes de temperatura, el primero inicia con disminución a razón de 10 °C por minuto hasta llegar a -15 °C y el segundo rango disminuye 25 °C por minuto hasta -150 °C, finalmente se introducen las pajillas en nitrógeno líquido para cualquiera de las técnicas (Blottner *et al.*, 2001).

Alteraciones del espermatozoide durante la criopreservación y su efecto en la vitalidad y capacitación

Las células se someten a estrés al alterar su temperatura fisiológica, en el caso de cuando se pretende almacenar las células por largos periodos de tiempo, ellas se llevan a temperaturas por debajo de cero grados, generalmente a -196 °C (criopreservación). Durante el periodo de transición, en el descenso de la temperatura desde 22 °C a 1 °C se puede ocasionar desprendimiento de fosfolípidos de la membrana y, con ello, pérdida de la permeabilidad, daño y muerte celular (Amann & Pickett, 1987).

La criopreservación es el estudio de los mecanismos que intervienen en el proceso de conservación y preservación de proteínas, células, tejidos, órganos e insectos a bajas temperaturas por largos periodos de tiempo (Hinojosa *et al.*, 2000). La reducción en la



temperatura permite disminuir el deterioro en los sistemas biológicos; sin embargo, también se presentan efectos nocivos durante este proceso, relacionados con la transformación del agua en cristales de hielo, los daños en la conformación lipídica de la membrana, la desnaturalización de las proteínas, daño osmótico y estrés oxidativo (Holt, 2000).

Un aspecto relevante para el éxito en los procesos de criopreservación, es evitar la formación de cristales de hielo en el medio intra y extracelular, para lo cual se adicionan crioprotectores (Luyet & Hodapp, 1938). Los crioprotectores favorecen la reducción de agua intracelular, sin deteriorar las concentraciones intra y extracelular de iones (Lovelock, 1953).

Criopreservación y daño celular

Particularmente, durante el proceso de criopreservación del espermatozoide, este se expone a variaciones en temperatura y osmolaridad, lo cual trae como consecuencia la formación de cristales de hielo y cambios en las moléculas que lo componen (Morris *et al.*, 2012). Los cambios en la osmolaridad incluyen la formación de un medio extracelular hiperosmótico, a lo cual responde la célula espermática perdiendo agua, con el objetivo de equilibrar el medio extra e intracelular. Durante la descongelación, la célula se expone a una solución hipotónica en el medio extracelular, con lo cual se permite la entrada de agua al medio intracelular por difusión pasiva, se incrementa el volumen espermático, dicho estrés osmótico puede afectar irreversiblemente la membrana celular y, con ello, disminuir la fertilidad (Scherzen *et al.*, 2009; Pommer *et al.*, 2002).

El daño causado por el choque térmico puede ocurrir cuando la membrana celular pasa de estado líquido a estado de gel (Loomis & Graham, 2008; Amann & Pickett, 1987), por lo tanto, en el proceso de congelación se busca evitar que los fosfolípidos de membrana se muevan lateralmente, y así evitar que formen en estado líquido pequeñas regiones lipídicas, a las cuales se adhieren proteínas, trayendo como consecuencia el incremento en la permeabilidad de la membrana y disminución de la actividad metabólica (Hammerstedt & Graham, 1992).

Las dos principales causas de disminución en la calidad seminal en procesos de congelación, son el daño en la estructura de membrana y el estrés osmótico (Watson, 2000), las cuales afectan el citoplasma, el citoesqueleto y la composición genética (Isachenko, 2003). El incremento en la permeabilidad de la membrana trae como consecuencia entrada de agua, iones y crioprotectores (Leahy & Gadella, 2011; Holt & North, 1986), entrada de Calcio (Ca) y activación de la motilidad, reactivación del proceso de capacitación y de fusión de la membrana plasmática y acrosómica (Ford *et al.*, 1994).

El daño a la membrana de la célula espermática durante el proceso de congelación, puede dar lugar a cambios en el espermatozoide que lo lleva a situación parecida a la capacitación denominada criocapacitación (Ellington *et al.*, 1993). La criocapacitación hace que el espermatozoide tenga más probabilidades de sufrir la reacción acrosómica, lo que disminuye el tiempo de vida del espermatozoide. Por lo tanto, el momento de la inseminación es más crítico cuando se utiliza semen congelado (Thomas *et al.*, 2006). Se ha propuesto aumentar la frecuencia de inseminaciones cuando se



utiliza semen congelado para mejorar la tasa de concepción (Vidament *et al.*, 1997). Sin embargo, estas recomendaciones llevarían a invertir más tiempo y costos para aplicar la inseminación artificial con semen congelado. Por lo tanto, se recomienda entonces reducir los daños causados por la sensibilidad al choque por el frío, y así mejorar la viabilidad de espermatozoides después de la descongelación.

Durante la capacitación, la membrana plasmática experimenta cambios que, con el choque térmico, hacen que esta sea menos permeable al agua y otros solutos y que sufra daño el acrosoma (Purdy, 2006). En la congelación, la membrana espermática toma una consistencia rígida y porosa (Watson, 2000), hay daño en los fosfolípidos de membrana, se produce una reestructuración de los mismos, ocasiona alteraciones en la permeabilidad y daño de membrana (Albrizido *et al.*, 2015), con lo cual se hacen más susceptibles a formación de cristales de hielo (Hammerstedt *et al.*, 1990). Los descensos de temperatura a razón de 0,5 a 1 grados centígrado por minuto, causa estrés en la membrana celular causada por daños en la doble capa lipídica (Watson, 2000).

Los estudios sobre las alteraciones en las concentraciones de Ca durante el proceso de congelación de los espermatozoides, han demostrado que el Ca ingresa al medio intracelular a través de canales de Ca dependientes de voltaje (VOCCs) y estos provocan detrimento en la fertilidad (Darszon *et al.*, 1999). Los canales catiónicos del espermatozoide (CatSper), junto con los canales de Ca sensibles a voltaje activados por alcalinización, se encuentran exclusivamente en las membranas de la cola del espermatozoide. El ambiente uterino

alcalino hace que se activen los CatSper dadas las alteraciones en la concentración iónica (Qi *et al.*, 2007). Los canales de Ca se cierran una vez se adhiere el espermatozoide al epitelio del oviducto, prolongando la vida del espermatozoide; tan pronto se reactiva el proceso de capacitación, se activan los canales de Ca liberándose de nuevo los espermatozoides (Boni *et al.*, 2007). Los niveles de Ca son mayores en el esperma equino comparado con otras especies (Leopold *et al.*, 1999), siendo la concentración de Ca 1,6 veces más elevada en el semen congelado comparado con el semen fresco, también se han encontrado diferencias entre concentraciones de Ca entre diferentes eyaculados del mismo semental tanto en semen fresco como congelado (Albrizido *et al.*, 2015).

Cambios en las concentraciones de Ca pueden inducir apoptosis, afectando la viabilidad y función espermática (Ball, 2008), en el que la vida del espermatozoide criopreservado pos capacitación se acorta aún más debido al incremento en la entrada de Ca (Leahy *et al.*, 2011), razón por la cual, el tiempo entre la realización de la inseminación y la ovulación es muy corto (Leopold *et al.*, 1999).

Control de calidad pos descongelación

En el proceso de descongelación ocurren cambios que alteran la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, como son: pérdidas de lipoproteínas, aminoácidos, liberación de *glutamin oxaloacetato trasaminasa*, disminución en colesterol débilmente unido a proteínas, incremento en el sodio y disminución en el potasio, inactivación de la acrosina y la hialorunidasa, pérdida de prostaglandinas, reducción en la síntesis de ATP y ADP y



la disminución en la actividad proteolítica acrosomal (Salomon & Maxwell, 1995).

Una vez congelado el semen, se debe proceder a evaluar mínimo tres pajillas por eyaculado. A la evaluación microscópica, la motilidad progresiva pos descongelación debe ser mayor o igual a 35 %. Para realizar la evaluación, se descongela la pajilla a 35 °C por 30 segundos; posteriormente, se diluye la pajilla en dos mL de INRA96® a 35 °C, se agita por 10 segundos y se deja en reposo por 10 minutos, manteniendo la misma temperatura; pasado ese tiempo, se agita nuevamente y se procede a realizar la evaluación de motilidad, vigor y morfología (de Geoffroy, 2015).

Crioprotectores utilizados en la congelación de semen equino

La criopreservación facilita el almacenamiento y transporte de material genético en procesos biotecnológicos de reproducción asistida (Sieme *et al.*, 2016) que requieren de sustancias crioprotectoras que minimicen el efecto citotóxico de la congelación-descongelación (Davidson *et al.*, 2014). El efecto crioprotector requiere la preservación de la membrana celular y de estructuras y moléculas intracelulares.

Existen dos tipos de crioprotectores: los permeables, que penetran la membrana celular y son pequeñas moléculas no iónicas, de los cuales los más empleados son el glicerol (GLY) y dimetilsulfoxido (DMSO) (Sieme *et al.*, 2016). En algunos casos donde los anteriores crioprotectores resultan tóxicos, también se pueden utilizar dimetilformamida (DMF), etilenglicol (EG), metilformamida (MFM) (Squires *et al.*, 2004). Este tipo de crioprotectores alcanzan

la misma distribución en el medio intra y extra celular, es decir, son osmóticamente inactivos; sin embargo, inicialmente el agua sale a mayor velocidad del medio intracelular comparado con la entrada del crioprotector, ocasionando disminución del tamaño de la célula y estrés osmótico; mientras el crioprotector alcanza la misma distribución intra y extracelular (Sieme *et al.*, 2016). Otro tipo de crioprotectores son los no permeables que inducen la deshidratación celular porque incrementan la osmolaridad del medio de criopreservación e incluyen los compuestos osmóticamente inactivos como polisacáridos (hidroxietil almidón y maltodextrina) y proteínas (albúmina y polivinilpirrolidona) y, compuestos osmóticamente activos como los disacáridos (sucrosa y trehalosa) (Oldenhof *et al.*, 2013).

GLY es un crioprotector que parece tener efectos tóxicos sobre el semen equino (Squires *et al.*, 2004), induce desnaturalización de las proteínas, cambio en las interacciones de la actina (Hammerstedt & Graham, 1992), estrés osmótico; ya que penetra en menor velocidad comparado con otros crioprotectores; a nivel intracitoplasmático, provoca incremento de la viscosidad, alteración en la polimeración de la tubulina y de la asociación de los microtúbulos (Gilmore *et al.*, 1995). Por estos efectos tóxicos, se han buscado otras alternativas con diferentes crioprotectores para incrementar la fertilidad con el semen congelado (Khlifaoui, 2005), se han empleado otras sustancias de menor peso molecular como la DMF (Henry *et al.*, 2002) con mejores resultados en el proceso de la criopreservación. El uso de DMSO y amidas mejoran la viabilidad y la motilidad pos descongelación en relación con el GLY (Alvarenga *et al.*, 2005).



La yema de huevo también se ha utilizado como crioprotector de semen, posee sustancias que inhiben la respiración de los espermatozoides, disminuyendo la motilidad (Kampschmidt *et al.*, 1953). La yema de huevo está compuesta por micropartículas de 35 nm de diámetro, que en el interior contienen triglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol. Dichas micropartículas están rodeadas por apoproteínas y lipoproteínas. El efecto crioprotector de la yema de huevo durante el proceso de congelación y descongelación se da porque contiene fosfolípidos (lecitina) y lipoproteínas de baja densidad que recubren la membrana espermática, disminuyendo el choque térmico (Medeiros *et al.*, 2002). Mediante centrifugación, es posible separarlas en dos fracciones, plasma y gránulos; el plasma contiene el 85 % de las lipoproteínas de baja densidad y 15 % de livetina. Este proceso se puede realizar a nivel industrial, garantizando la esterilidad del plasma por medio de radiación gamma. El efecto protector del plasma de la yema de huevo evidencia resultados favorables de 69 % en tasa de preñez, frente a un crioprotector compuesto con yema de huevo entero con un 60 % (Pillet *et al.*, 2011).

El diluyente INRA fue desarrollado en Francia por el *French National Institute for Agricultural Research*, este contiene, entre otros compuestos, la lactosa y se le adiciona un 2 % con yema de huevo y un 2,5 % de GLY. Inicialmente, se llamó INRA82® y una versión mejorada el INRA96 se le adicionó la fosfocaseína. Se logró mejorar la tasa de preñez al 70 % con el INRA96 comparada con el diluyente INRA82® que presentó un 41 % de preñez. Mediante citometría de flujo, se determinó que con el INRA96® la membrana espermática presentaba mejor

integridad; sin embargo, la motilidad progresiva analizada mediante análisis asistido por computador no evidenciaron diferencias significativas con promedios de 41 % y 38 % entre los dos medios INRA82® e INRA96®, respectivamente (Pillet *et al.*, 2008). El empleo de INRA82® en semen de raza Hanoveriana logró una motilidad progresiva de 62,3 % \pm 9,35 y 24,0 % \pm 15,4; porcentajes de preñez de 40 % y 10 % en semen congelado y recongelado, respectivamente (Sielhorst *et al.*, 2016).

“La ciclodextrina es oligosacárido cíclico con un centro hidrofóbico capaz de transportar colesterol por gradiente de concentración desde y hacia las membranas plasmáticas” (Moore *et al.*, 2005). En Colombia, Mesa & Henao (2012) emplearon el diluyente Kenney modificado (45 % de sucrosa, 29 % de glucosa y 26 % de leche descremada) más la adición de colesterol y ciclodextrina (1,5 mg con colesterol por cada 120×10^6 espermatozoides), como modificador de membrana, en caballos criollos; encontrando motilidad progresiva pos descongelación de 30 %, mientras que cuando al diluyente Kenney modificado se le adicionó GLY al 5 %, la motilidad fue de 20 %.

También se encuentran productos en el mercado, que contienen caseínas altamente purificadas (Equipro®, Gent®). Estos productos se evaluaron en el semen de caballos criollos, en los que se presentaron diferencias significativas en la motilidad total pos descongelación, cuando se adicionó con 5 % de DMF y 4 % de yema de huevo y Equipro® o yema de huevo y Gent®, (motilidad de 50,9 % \pm 19,4 % vs 42,2 % \pm 15,1 %), respectivamente (Restrepo *et al.*, 2014).

Wu *et al.* (2015) evaluaron el efecto de varios crioprotectores adicionados al medio INRA 96® (GLY, EG, DMSO, MFM, y DMF) a concentraciones del 2,5 %, 3,5 % y 5 %, encontraron que adición de MFM o DMF mejora la motilidad progresiva, viabilidad y potencial de membrana mitocondrial pos descongelación significativamente. Por ejemplo, la motilidad progresiva y vitalidad fue de $69,00 \pm 3,61$ y $34,00 \pm 3,46$, respectivamente, con el uso de DMF al 3,5 % mientras que para DMSO al 3,5 % fue $36,33 \pm 1,53$ y $15,33 \pm 2,52$.

Resultados de fertilidad con diferentes diluyentes

Como se ha mencionado anteriormente, los protocolos de criopreservación varían ampliamente entre los diferentes laboratorios, los resultados en cuanto a la evaluación posterior a la descongelación también son variables y, aún más, las tasas de preñez cuando se inseminan las yeguas; ya que intervienen más factores no relacionados directamente con el protocolo de criopreservación. Los resultados de fertilidad con la utilización

de semen congelado difieren ampliamente (tabla 1), sin embargo, se evidencian avances científicos importantes que hacen que la criopreservación sea una alternativa viable y promisoría.

Se recomienda depositar el semen congelado, de manera profunda, en el cuerno uterino para ayudarle a su avance hacia el oocito. Con la inseminación intrauterina profunda, a dosis de 25 millones con semen centrifugado por la técnica de Percoll, se han obtenido porcentajes de preñez entre el 30 y 60 % (Nie *et al.*, 2003). Si el semen es de buena motilidad (42 %) o baja de motilidad progresiva (27 %) pos descongelación, se obtiene 63,3 y 28,6 % de preñez, respectivamente (Ribeiro *et al.*, 2015). Se recomienda utilizar el semen posterior a la descongelación con un mínimo de 35 % de espermatozoides móviles (Barrier-Battut, 2013). Los porcentajes de preñez son bajos cuando se usa para la inseminación semen sexado, se ha logrado del 0 a 13 % (Lindsey *et al.*, 2002). Gibb *et al.*, en 2012, obtuvieron 27,3 % por medio de inseminación por histeroscopia, aunque con casos de muerte embrionaria.



Tabla 1. Porcentaje de preñez en yeguas inseminadas con semen criopreservado utilizando diferentes protocolos de congelación.

Crioprotector	Motilidad	Porcentaje de preñez	Semental	Autores
INRA82® (lactosa) congelado	62,3 ± 9,3	40	Hanoveriana	Sielhorst <i>et al.</i> , 2016
INRA82® (lactosa) re-congelado	24,0 ± 15,4	10	Hanoveriana	Sielhorst <i>et al.</i> , 2016
INRA 96® (lactosa y fosfocaseína)+ INRA 96® (lactosa y fosfocaseína)+ 1.5 mg/mL de 2- hidroxipropil beta-ciclodextrina cholesterol	36		Caballos de deporte y Pony	Blommaert <i>et al.</i> , 2016
INRA Freeze® (lactosa y yema de huevo)	32		Caballos de deporte y Pony	Blommaert <i>et al.</i> , 2016
INRA 96® (lactosa y fosfocaseína) + 3,5% metilformamida	69,0 ± 3,6		Yili	Wu <i>et al.</i> , 2015
Botu-Crio Botupharma, Botucatu, (yema de huevo) caballo alta fertilidad	42,1 ± 3,1	80	Westfalen	Ribeiro <i>et al.</i> , 2015
Botu-Crio Botupharma, Botucatu,(yema de huevo) caballo baja fertilidad	27,0 ± 1,4	21,4	Mangalarga Marchador	Ribeiro <i>et al.</i> , 2015
INRA 96® + 3,5% dimetilsulfoxido	36,3 ± 1,5		Caballo Criollo Colombiano	
Kenney modificado + Colesterol+ ciclodextrina	30		Caballo Criollo Colombiano	Mesa & Henao 2012
Kenney modificado + Glicerol al 5%	20		Caballo Criollo Colombiano	Mesa & Henao 2012
Equipro® (caseína)	50,9 ± 19,4		Caballo Criollo Colombiano	Restrepo <i>et al.</i> , 2014
Gent® (yema de huevo)	42,2 % ± 15,1		Caballo Criollo Colombiano	Restrepo <i>et al.</i> , 2014
INRA96® + 2% yema de huevo + 2.5% glicerol	38	70	Wels	Pillet <i>et al.</i> , 2008
INRA82® + 2% yema de huevo + 2.5% glicerol	41	41	Wels	Pillet <i>et al.</i> , 2008

Desde el primer logro de una preñez con semen de equino congelado, lograda en 1957 por los canadienses Barker y Gandier (1957) con espermatozoides recuperados de los epidídimos y diluidos con leche entera caliente y 10% de glicerol, los resultados en la literatura no son concluyentes. Se encuentran grandes diferencias en viabilidades, posterior a la descongelación del semen; aunque un semen presente una viabilidad alta recién se descongela, es necesario que demuestre altas tasas de gestación. La mayoría de las publicaciones en las cuales se presentan diferentes protocolos para evaluar la eficiencia posterior a la descongelación no presentan resultados en cuanto número de preñeces cuando se utilizan comercialmente. Aún persisten sementales que congelan mejor con un diluyente o un crioprotector específico, estas individualidades son muy comunes, lo que no ocurre tan frecuente

en bovinos. Sin embargo, ya es posible ofrecer semen sexado equino en pajillas de 0.25 o 0.5 mL. Persiste el inconveniente de la corta viabilidad del semen posterior a la descongelación y, por lo tanto, la necesidad de seguir de cerca el celo de la yegua e inseminar muy cercano a la ovulación.

La congelación de semen equino es una biotecnología que, en la actualidad, es viable aunque no muy difundida; sin embargo, muestra buenos resultados independientemente de la técnica que se emplee; el aspecto más importante y limitante es la respuesta individual de cada caballo al proceso de criopreservación. Se deben buscar nuevas técnicas de congelación que permitan mejorar la fertilidad de los sementales que responden pobremente a la técnica, pero que, en algunos casos, son de gran valor genético y que requieren la congelación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRIZIDO, M., MORAMARCO, A., NICASSIO, M., MICERA, E., ZARRILLI, A. & LACALANDRA., G. M. 2015. Localization and functional modification of L-type voltage-gated calcium channels in equine spermatozoa from fresh and frozen semen. *Theriogenology* 83(3): 421-429.
- ALLEN, W. 2005. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction in domestic animals* 40(4): 310-329.
- ALVARENGA, M., PAPA, F. & BURATINI JR, J. 2000. The effect of breed spermatoc parameters over equine semen freezability. *Theriogenology* 54: 29-136.
- ALVARENGA, M., PAPA, F., LANDIM-ALVARENGA. & MEDEIROS, A. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal Reproduction Science* 89 (1):105-13.
- AMANN, R. & PICKETT, B. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of equine veterinary science* 7 (3): 145-173.
- AURICH, C. & SPERGSER, J. 2007. Influence of bacteria and gentamicin on cooled stored stallion spermatozoa. *Theriogenology* 67 (5): 912-918.
- BALL, B. 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science* 107 (3): 257-267.



- BARBAS, J. & MASCARENHAS, D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue banking* 10 (1): 49-62.
- BARKER, C. & GANDIER, J. 1957. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative medicine and veterinary science* 22: 47-51.
- BARRIER, I., KEMPFER, A., BECKER, J., LEBAILLY, L., CAMUGLI, S. & CHEVRIER, L. 2016. Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology* 86 (4):1111-1131.
- BARRIER-BATTUT, I. 2013. Collecte et traitement de la semence d'étalon: quoi de neuf. *Pratique Vétérinaire Équine* 177(45): 35-39.
- BLOMMAERT, D., FRANCK, T., DONNAY, I., LEJEUNE, J., DETILLEUX, J. & SERTEYN, J. 2016. Substitution of egg yolk by a cyclodextrin-cholesterol complex allows a reduction of the glycerol concentration into the freezing medium of equine sperm. *Criobiology* 72(1):27-32.
- BLOTTNER, S., WARNKE, C., TUCHSCHERER, A., HEINEN, V. & TORNER, H. 2001. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science* 65(1): 75-88.
- BONI, R., GUALTIERI, R., TALEVI, R. & TOSTI, E. 2007. Calcium and other ion dynamics during gamete maturation and fertilization. *Theriogenology* 68 (Supplement 1): 156-164.
- CLEMENT, F., GUERIN, B., VIDAMENT, M., DIEMERT, S. & PALMER, E. 1993. Microbial quality of stallion semen. *Pratique Vétérinaire Equine* 25 (1): 37- 43.
- CLULOW, J., MANSFIELD, L., MORRIS, L., EVANS, G. & MAXWELL, W. 2008. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 108 (3): 298-308.
- COCHRAN, J., AMANN, R., SQUIRES, E. & PICKETT, B. 1983 Fertility of frozen thawed stallion semen extended in Lactose EDTA egg yolk extender and packaged in 1.0 ml straws. *Theriogenology* 20 (6): 735-741.
- DARSZON, A., LABARCA, P., NISHIGAKI, T. & ESPINOSA, F. 1999. Ion channels in sperm physiology. *Physiological Reviews* 79 (2): 481-510.
- DAVIDSON, A., BENSON, J. & HIGGINS, A.Z. 2014. Mathematically optimized cryoprotectant equilibration procedures for cryopreservation of human oocytes. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 11(1), 1.
- DAVIES, M. & MINA, C. 2003. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. Cambridge, MA, USA: CABI Publishing. Web. 24 June 2015.
- DE GEOFFROY, F. 2015. Freezing of stallion semen. *La jumeterie du Pin*. Conferencia. IFCE.
- ECOT, P.G., DECUADRO-HANSEN, G., DELHOMME, G. & VIDAMENT, M. 2005. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. *Animal Reproduction Science* 89 (1-4): 245-248.
- ELLINGTON, J., BALL, B., BLUE, B. & WILKER, C. 1993. Capacitation-like membrane changes and prolonged viability

- in vitro of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells. *American Journal of veterinary research* 54 (9): 1505-1510.
- FAYRER-HOSKEN, R., ABREU-BARBOSA, C., HEUSNER, & JONES, L. 2008. Cryopreservation of stallion spermatozoa with INRA96 and Glycerol. *Journal of equine veterinary science* 28 (11): 672-676.
- FORD, T., GRAHAM, J. & RICKWOOD, D. 1994. Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Analytical biochemistry* 220 (2): 360-366.
- GIBB, Z., GRUPEN, C., MAXWELL, W. & MORRIS, L. 2012. Improvements in the fertility of cryopreserved, sex-sorted stallion sperm after low-dose hysteroscopic insemination. *Journal of equine veterinary science* 32: 397-422.
- GILMORE, J., MCGANN, L., LIU, J., GAO, D., PETER, A., KLEINHANS, F. & CRITSER, J. 1995. Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biology of reproduction* 53 (5): 985-995.
- GUIMARÃES, T., LOPES, G., PINTO, M., SILVA, E., MIRANDA, C., CORREIA, M., DAMÁSIO, L., THOMPSON, G. & ROCHA, A. 2015. Colloid centrifugation of fresh stallion semen before cryopreservation decreased microorganism load of frozen-thawed semen without affecting seminal kinetics. *Theriogenology* 83 (2): 186-191.
- HAMMERSTEDT, R., & GRAHAM, J. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29 (1): 26-38.
- HAMMERSTEDT, R., GRAHAM, J. & NOLAN, J. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of andrology* 11(1): 73-88.
- HEITLAND, A., JASKO, D., SQUIRES, E., GRAHAM, J., PICKETT, B., & HAMILTON, C. 1996. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine veterinary journal* 28 (1): 47-53.
- HENRY, M., SNOECK, P. & COTTORIELLO, A. 2002. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology* 58 (2): 245-48.
- HINOJOSA, F., MANZANO, F., & GARCÍA, M. 2000. Crioterapia: fundamentos físicos y técnicos. *SEMERGEN - Medicina de familia* 26: 14-16.
- HOLT, W. & NORTH, R. 1986. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility* 78 (2): 447-457.
- HOLT, W. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction science* 62 (1): 3-22.
- HOUSEHOLDER, D., PICKETT, B., VOSS, J. & OLAR, T. 1981. Effect of extender, number of spermatozoa and hCG on equine fertility. *Journal of Equine veterinary science* 1 (1): 9-13.
- ISACHENKO, E. 2003. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproduction biomedical online* 6 (2): 191-200.
- JOHNSON, L & WELCH, G. 1999. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum



- efficiency. *Theriogenology* 52 (8): 1323-1341.
- KAMPSCHMIDT, R., MAYER, D. & HERMAN, H. 1953. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *Journal of Dairy Science* 36 (7): 733-742.
- KENNEY, R., BERGMAN, R., COOPER, W. & MORSE, G. 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: *Proceedings of the Annual Conference of the American Association Equine Practitioners (Boston, U.S.A.)*. 327-336.
- KENNEY, R., EVENSON, D., GARCIA, M. & LOVE, C. 1995. Relationship between sperm chromatin structure, motility, and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate. *Biology of Reproduction Mono* 1: 647-653.
- KHLIFAOU, M., BATTUT, I., FRANÇOIS, J., CHATAGNON, G., TRIMECHE, A. & TAINURIER, D. 2005. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology* 63 (1), 1: 138-149.
- KUISMA, P., ANDERSSON, M., KOSKINEN, E. & KATILA, T. 2006. Fertility of frozen thawed stallion semen cannot be predicted by the current used laboratory methods. *Acta Veterinaria Scandinavica* 48 (1): 14-21.
- LEAHY, T. & GADELLA, B. 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* 142 (6): 759-78.
- LEOPOLD, S., SAMPER, J., CURTIS, E. & BUHR, M. 1999. Effect of cryopreservation and oviductal cell conditioned media on Ca²⁺ flux of equine spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 56: 431-45.
- LINDSEY, A., MUCKLE, L. & SQUIRES, E. 2003. Effects of Caffeine stimulation on stallion sperm motion characteristics following 18 h storage, flow-sorting and cryopreservation. *Theriogenology* 59: 510.
- LINDSEY, AC., MORRIS, L., SCHENK, J., GRAHAM, J., BRUEMMER, J., & SQUIRES, E. 2002. Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal* 34: 128-132.
- LOOMIS, P. & GRAHAM, J. 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science* 105 (1): 119-128.
- LOOMIS, P., AMANN, R., SQUIRES, E. & PICKETT, B. 1983. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. *Journal of Animal Science* 56 (3): 687-693.
- LOVELOCK, J. 1953. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta* 11: 28-36.
- LUYET, B & HODAPP, E. 1938. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Experimental Biology Medicine* 39 (3): 433-434.
- MARI, G., BUCCI, D., LOVE, C., MISLEI, B., RIZZATO, G., GIARETTA, E., MERLO, B. & SPINACI, M. 2015. Effect of cushioned



- or single layer semen centrifugation before sex sorting on frozen stallion semen quality. *Theriogenology* 83 (6): 953-958.
- MARTIN, J., KLUG, E. & GÜNZEL, A. 1978. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 27: 47-51.
- MEDEIROS, C., FORELL, F., OLIVEIRA, A. & RODRIGUES, J. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better?. *Theriogenology* 57 (1): 327-344.
- MESA, A. & HENAO, G. 2012. Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. *Revista MVZ Córdoba* 17(1): 2908-2915. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v17n1/v17n1a14.pdf>. Accesado 12/07//2015.
- MOORE, A., SQUIRES, E. & GRAHAM, J. 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51(3): 241-249.
- MORRELL J, WINBLAD, C. & JOHANNISSON A. 2012. Production of reactive oxygen species is lower in stallion spermatozoa after single layer centrifugation with Androcoll-E. *Journal of Equine Veterinary Science* 32 (8): 500.
- MORRELL J. 2012. Stallion sperm selection: past, present, future. *Journal of Equine Veterinary Science* 32 (8): 436-440.
- MORRIS, G., ACTON, E., MURRAY, B.J. & FONSECA, F. 2012. Freezing injury: the special case of the sperm cell, *Cryobiology* 64 (2): 71-80.
- NIE, G., JOHNSON, K. & WENZEL, J. 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): 103-109.
- OLDENHOF, H., GOJOWSKY, M., WANG, S., HENKE, S., YU, C., ROHN, K., WOLKERS, W. & SIEME, H., 2013. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents. *Biology and reproduction* 88 (3): 68.
- PICKETT, B., SQUIRES, E. & MCKINNON, A. 1989. Influence of insemination volume and sperm number on fertility. In: Pickett BW, Squires EL, McKinnon AO, editors. *Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Bulletin* 03: 51-59.
- PILLET, E., BATELLIER, F., DUCHAMP, G., FURSTOSS, V., VERN, Y., KERBOEUF, D., VIDAMENT, M. & MAGISTRINI, M. 2008. Freezing stallion semen in INRA96®-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy Science & Technology* 88 (2): 257-265.
- PILLET, E., DUCHAMP, D., BATELLIER, F., BEAUMAL, V., ANTON, M., DESHERCES, S., SCHMITT, E. & MAGISTRINI, M. 2011. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology* 75 (1): 105-114.
- POMMER, A., RUTLLAND, J. & MEYERS, S. A. 2002. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology* 58 (7): 1373-1384.
- PURDY, P. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 63 (3): 215-225.



- QI, H., MORAN, M., NAVARRO, B., CHONG, J., KRAPIVINSKY, G., KRAPIVINSKY, L., *et al.* 2007. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (4): 1219-1223.
- RESTREPO, G., USUGA, A., MONTOYA, J., CELIS, A. & HENAO, A. 2014. Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista Lasallista de Investigación* 11(2): 63-70.
- RIBEIRO, B., DOS SANTOS, R., MARQUES, G., GORZONI, E., TRINCA, L., DELL'AQUA, J., CELY, JR., MELO, M., SOARES, F., ALVARENGA, M., & OZANAM, F. 2015. Fixed-time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions?. *Theriogenology* 83 (9): 1389-1393.
- SALAMON, S. & MAXWELL, W. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Review Article. *Animal Reproduction Science* 37 (3-4): 185-249.
- SAMPER, J. & MORRIS, C. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 149 (5): 895-903.
- SCHERZER, J., FAYRER-HOSKEN, R., ACEVES, M., HURLEY, D., RAY, L., JONES, L. & HEUSNER, G. L. 2009. Freezing equine semen: the effect of combinations of semen extenders and glycerol on post-thaw motility. *Austrian Veterinary Journal* 87 (7): 275-279.
- SIELHORST, J., HAGEN, C., BEHRENDT, D., SCHUETTE, B., BURGER, D., MARTINSSON, G. & SIEME, H. 2016. Effect of multiple freezing of stallion semen on sperm quality and fertility. *Journal of Equine Veterinary Science* 40: 56-61.
- SIEME, H., HARRISON, R.A.P. & PETRUNKINA, A. 2008. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal Reproduction Science* 107 (3): 276-292.
- SIEME, H., KNOP, K. & RATH, D. 2006. Effects of cushioned centrifugation on sperm quality in stallion semen stored cooled at 5 degrees C for 24 h, and stored cooled for 2 or 24 h and then frozen. *Animal Reproduction Science* 94 (1-4): 99-103.
- SIEME, H., OLDENHOF, H. & WOLKERS, W. 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science* 169: 2-5.
- SQUIRES, E., KEITH, S. & GRAHAM, J. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62 (6): 1056-65.
- STUHTMANN, G., OLDENHOF, H., PETERS, P., KLEWITZ, J., MARTINSSON, G. & SIEME, H. 2012. Iodixanol density gradient centrifugation for selecting stallion sperm for cold storage and cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 133 (3): 184-190.
- THOMAS, A., MEYERS, S. & BALL, B. 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* 65 (8): 1531-1550.
- TISCHNER, M. 1979. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility* (27): 53-59.
- VARNER, D., LOVE, C., BRINSKO, S., BLANCHARD, L., HARTMAN, D., BLISS, S., *et al.* 2008. Semen processing



- for the subfertile stallion. *Journal of Equine Veterinary Science* 28 (11): 677-685.
- VIDAMENT, M., DUPERE, A. M., JULIENNE, P., EVAIN, A., NOUE, P., & PALMER, E. 1997. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48 (6): 907-917.
- WAITE, J., LOVE, C., BRINSKO, S., TEAGUE, S., SALAZAR, JR., MANCILL, J. & VARNER, D. 2008. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology* 70 (4): 704-714.
- WATSON, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60: 481-492.
- WOCKENER, A & SCHUBERTH, H. 1993. Freezing of maiden stallion semen-motility and morphology findings in sperm cells assessed by various staining methods including a monoclonal antibody with reactivity against an antigen in the acrosomal ground substance. *Reproduction in domestic animals* 28(4): 265-272.
- WU, Z., ZHENG, X., LUO, Y., HUO, F., DONG, H., ZHANG, G., YU, W., TIAN, F., HE, L. & CHEN, J. 2015. Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combinations of cryoprotectants. *Animal Reproduction Science* 163: 75-81.



