

Inseminación artificial

en la especie equina

Consuelo Serres Dalmau, Ana Laura Álvarez Gutiérrez De Rozas

Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria,
Universidad Complutense de Madrid
Avd. Puerta de Hierro S/N 28040 Madrid
cserres@vet.ucm.es

Resumen

La refrigeración y congelación del semen equino son un medio muy importante para la difusión de material genético permitiendo por ejemplo la utilización de semen procedente de sementales lejanos, lesionados o incluso muertos y aunque presentan una serie de inconvenientes, las ventajas de poder mantener el semen a corto-medio y largo plazo y de transportarlo y emplearlo posteriormente a su recogida, hacen de la inseminación artificial una técnica ampliamente utilizada a escala mundial en la especie equina.

Palabras Clave: equino, semen, refrigeración, congelación, inseminación artificial.

INTRODUCCIÓN

En la especie equina se puede realizar inseminación artificial con semen fresco, con semen refrigerado y con semen congelado.

La refrigeración y conservación a corto plazo del semen es un medio muy importante para la difusión de material genético, ya que asegura un lapso de tiempo suficiente para el traslado del semen hasta el lugar en que se encuentra la yegua, con un bajo coste y permitiendo el mayor y mejor empleo de los machos de alto valor genético.

Rusia y China fueron los países promotores de la inseminación artificial en los équidos y de su aplicación a gran escala, a finales del siglo XIX. Años más tarde, Nishikawa en 1912 en Japón, McKenzie en 1939 y Berliner en 1942 en Estados Unidos¹, comenzaron a estudiar

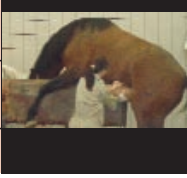
técnicas para la recogida, el procesado y la inseminación de semen procedente de caballos y de asnos.

La congelación de semen permite el almacenamiento de material genético de forma indefinida^{2,3,4} lo que a su vez nos otorga una serie de ventajas como serían: su posterior empleo dentro de los planes de recuperación de una raza⁵, la utilización de semen procedente de sementales enfermos, lesionados o incluso muertos, la continuación de la época reproductiva independientemente de la localización geográfica del macho, la realización de mejora genética mediante la utilización de machos de alto valor genético, el aumento del número de hembras cubiertas por un macho en particular y la disminución del riesgo de contagio de enfermedades de transmisión sexual.

Por contra hemos de citar también una serie de inconvenientes de la inseminación artificial con semen congelado como son: un menor porcentaje de fertilidad que

TABLA I

TIPO DE I.A.	PROCESADO
Semen fresco:	Tras recoger el semen se usa inmediatamente (ya sea diluido o sin diluir). El semen fresco y diluido, conservado a 22°C y protegido de la luz, se puede usar durante un margen no mayor a tres horas.
Semen refrigerado:	Tras la recogida del semen se agrega un diluyente determinado y se refrigera lentamente hasta 15 ó 4°C, conservando su capacidad fecundante durante un margen de hasta 36 horas y permitiendo ser transportado en envases especiales en ese intervalo de tiempo.
Semen congelado:	Tras la recogida del semen se procesa específicamente para su congelación y se introduce en nitrógeno líquido, conservando indefinidamente su capacidad fecundante.



el semen fresco o refrigerado, requiere un conocimiento más amplio y gran experiencia sobre manejo del semen, criobiología e inseminación artificial, al tener menor longevidad en la hembra que el semen refrigerado requiere un mayor control de ésta y una gran sincronía entre la inseminación y la ovulación, elevado coste económico, no todos los machos son susceptibles a la crioconservación del semen y finalmente que la selección de las hembras ha de ser más estricta a la hora de inseminar con semen congelado.

A pesar de estos inconvenientes las ventajas de poder mantener el semen a corto-medio y largo plazo y de transportarlo y emplearlo posteriormente a su recogida hacen de la inseminación artificial una técnica ampliamente utilizada a escala mundial en la especie equina.^{6,7}

RECOGIDA Y MANEJO DEL SEMEN

El manejo del semen para su posterior uso en inseminación artificial debe ser muy escrupuloso evitando que sufra dete-

rioro alguno, hay que tener en cuenta que no sólo queremos que el semen presente unas características adecuadas en el momento de la recogida, sino que queremos que mantenga su potencial fecundante, un manejo deficiente del semen va a provocar un descenso en su longevidad y por tanto un descenso importante de la fertilidad.

El primer punto crítico es el semen recién recogido, que es extremadamente vulnerable porque el plasma seminal tiene una baja capacidad de protección y además los espermatozoides presentan un metabolismo elevado en esos momentos; por lo tanto el semen necesita que se procese rápidamente para evitar que los espermatozoides se deterioren.

El segundo punto crítico son los cambios de temperatura, a los que los espermatozoides son muy sensibles, así todo el material que vaya a entrar en contacto con el semen debe de estar entre 36-38°C; el shock térmico produce cambios irreversibles e inmediatos que se observarán en la evaluación inicial del semen y que también afectarán a la fertilidad.

TABLA II

VENTAJAS DE LA I.A.

- prolongación de la supervivencia de los espermatozoides
- protección de los espermatozoides de condiciones adversas
- aumento del volumen del eyaculado con el fin de aumentar el número de hembras cubiertas.
- reducción de la posibilidad de transmisión de enfermedades a través de la exposición de las hembras a un nuevo ambiente
- incremento de la mejora genética y disminución de la consanguinidad, ya que permite utilizar un semental distinto al de la zona más próxima o de valor genético superior.
- eliminación de los costes y riesgos del transporte de las hembras
- se reducen los accidentes que la hembra pueda producir al macho en la monta.

TABLA III

INCONVENIENTES DE LA I.A.

- necesidad de conocer la metodología y tener la experiencia suficiente para poder llevar a cabo esta técnica; todo el personal que vaya a manipular el semen ha de tener conocimiento de cómo hacerlo de forma apropiada.
- requiere de una tecnología y un equipamiento mínimo que permita una correcta recolección, evaluación, dilución y preparación del semen y de las dosis seminales.
- no todos los sementales poseen un semen capaz de soportar los sistemas de refrigeración y congelación.
- es necesario llevar un perfecto control del ciclo estral de la hembra pues en muchas ocasiones, un manejo reproductivo deficiente (mala detección de celos, desconocimiento del momento y frecuencia de las inseminaciones) puede provocar un descenso en la fertilidad.
- los costes se ven incrementados pues es necesario llevar a cabo la preparación y el almacenamiento del semen y el control del ciclo estral de la hembra.

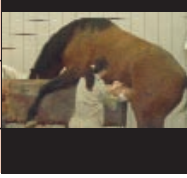
SEMEN FRESCO

La dilución del semen para su uso en fresco aporta una serie de ventajas⁸; como la prolongación de la supervivencia de los espermatozoides, la protección de los espermatozoides de las condiciones ambientales adversas, el tratamiento antibiótico del semen cuando éste contiene microorganismos patógenos, la mejora de la viabilidad de los espermatozoides de algunos sementales de baja fertilidad, la estimación adecuada de la motilidad y el aumento del volumen del eyaculado con el fin de repartirlo entre varias hembras.

Una vez recogido el semen procederemos a realizar el análisis seminal e inmediatamente se diluirá con un diluyente que conserve el pH y la presión osmótica y que esté atemperado a 37°C, una vez diluido el semen se deberá conservar a temperatura ambiente (22°C) y al refugio de la luz hasta el momento de la inseminación (alrededor de tres horas).

SEMEN REFRIGERADO

La refrigeración del semen disminuye el metabolismo basal de los espermatozoides alargando la vida de éstos, pero por otra parte esta disminución de la temperatura provoca una serie de daños en la célula que se conocen como choque por frío, “shock por frío” o “cold shock”. El choque por frío no es un fenómeno específico de los espermatozoides sino de todas las células expuestas al frío. La refrigeración induce efectos más marcados en la fertilidad que en la motilidad seminal ya que no hay que olvidar que hay otros elementos de la membrana que pueden alterarse con la bajada de temperatura como las proteínas implicadas en el transporte de iones¹⁰. También se producen otros efectos en la célula como la pérdida de lípidos¹¹ y potasio¹² y la disminución de la capacidad enzimática y de transporte de las proteínas¹⁰.



La refrigeración del semen equino requiere un procesado que incluye:

Dilución y preparación de las dosis inseminantes:

Para la refrigeración de semen de los équidos se han utilizado muchos tipos de diluyentes, como crema de gelatina¹³, leche descremada-glucosa¹⁴, CCH-27¹⁷, yema de huevo-tris-fructosa-glicerol¹⁵, INRA 82 y 96^{16,17,18} o VITAL+20¹⁹ entre otros. Los diluyentes deben mantener la presión osmótica y el pH estables, aportar nutrientes y una composición mineral adecuada, así como sustancias que protejan de la bajada de temperatura⁸. La leche y la yema de huevo contienen lipoproteínas de baja densidad (fosfolípidos) que poseen la propiedad de estabilizar las membranas celulares.^{21,10}

La longevidad de los espermatozoides en refrigeración está relacionada con la concentración y el grado de dilución; así el semen muy concentrado debe ser diluido en mayor medida que un semen poco concentrado^{22,23,24}. Una dilución adecuada del semen debería tener una proporción de volumen de una parte de semen por tres de diluyente (como mínimo).

En caballos se ha establecido que 500.10⁶ de espermatozoides con motilidad progresiva y morfológicamente normales, cuando utilizamos semen fresco/refrigerado aseguran porcentajes de preñez óptimos^{25,26}. El volumen de inseminación suele ser de 10 a 30 ml²⁷ aunque la fertilidad está mucho más relacionada con el número de espermatozoides móviles y con morfología normal que del volumen de inseminación y depende en un elevado grado de la concentración, de las dosis seminales, la cual ha de mantenerse entre 25 y 50 millones de espermatozoides móviles por mililitro.^{28,29}

Centrifugación del semen:

El plasma seminal en los équidos está constituido por las secreciones procedentes de testículo, epidídimo, próstata y vesículas seminales. La centrifugación del semen tiene como finalidad la retirada del plasma seminal y la concentración del eyaculado, para así permitir hacer diluciones más altas y pudiendo minimizar el daño celular y mejorar la fertilidad del semen refrigerado.^{30,31}

Algunos autores sugieren que la variabilidad individual en la composición del plasma seminal afecta a la motilidad del semen refrigerado^{32,33} y recomiendan una mayor dilución del semen para minimizar estos efectos^{34,35} o la centrifugación del semen antes de su refrigeración para incrementar la motilidad del semen refrigerado de aquellos sementales “malos refrigeradores”.^{32,33,36}

Ritmos y curvas de refrigeración y mantenimiento del semen:

La velocidad de refrigeración es una variable muy importante en la aparición del shock por frío^{37,38}; con el estudio de distintas velocidades de refrigeración del semen de caballo mediante sistemas programables o sistemas pasivos se ha podido comprobar que se obtienen mejores resultados cuando los ritmos de refrigeración son bajos^{37,39,40,41,42}, obteniendo mejores resultados a velocidades menores de $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$.^{40,41}

La velocidad de enfriamiento de los espermatozoides equinos ha de ser aquella que minimice las alteraciones de la membrana; los ritmos de refrigeración lentos permiten que tanto los lípidos como las proteínas de membrana se reorganicen a lo largo de ella lo que previene un daño a

gran escala³⁸. Con un sistema de refrigeración pasiva como el Equitainer®, se obtiene una velocidad de refrigeración entre $-0.06^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $-0.01^{\circ}\text{C}/\text{min}$.⁴³

Se considera generalmente la temperatura de 4 a 6°C como la más adecuada para la conservación de la motilidad^{38,41,42} y de la fertilidad del semen de caballo²². En los últimos años investigadores franceses están estudiando la conservación del semen a 15°C , bajo la hipótesis de que a esta temperatura se reducirían los daños en la membrana plasmática de los espermatozoides producidos por el choque frío.^{19,44,45}

El tiempo de conservación afecta a la motilidad y a la fertilidad del semen refrigerado^{42,46,47}; el semen de caballo conservado a 4°C mantiene unos buenos índices de motilidad y fertilidad durante las primeras 12-36 horas, y otros autores obtuvieron buenos índices de fertilidad tras inseminar con semen mantenido a 15°C durante 24 ó 72 horas en un medio definido (INRA-96).^{19,44}

SEMEN CONGELADO

El desarrollo de un buen protocolo de congelación-descongelación de los esper-



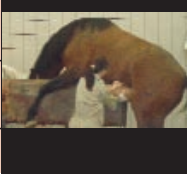
Recogida de semen.



Sistemas de refrigeración y transporte de semen.

matozoides persigue mantener las funciones espermáticas tras la descongelación: la motilidad, el metabolismo para la producción energética y la integridad de las membranas acrosomal y plasmática necesarias para la penetración y fusión con el óvulo en la fecundación. La pérdida de una sola de estas características podría reducir o suprimir totalmente la fertilidad del espermatozoide².

Las principales alteraciones que pueden producirse en los espermatozoides durante la congelación y descongelación de la célula y que pueden dañar sus funciones proceden de cambios en la membrana derivados del propio enfriamiento, de la formación de cristales de hielo intra y extracelulares, de la deshidratación celular, del aumento de la concentración de solutos y de las alteraciones morfológicas de la membrana plasmática que ocurren durante los procesos de deshidratación y rehidratación². Todas estas alteraciones dañan en mayor o menor medida a los espermatozoides, de hecho las células descongeladas son más lábiles que las células no procesadas y la longevidad de la motilidad es inferior en las células descongeladas.^{21,48,49}



Crioprotectores:

Los crioprotectores se añaden al medio para disminuir los efectos generados por el paso del agua de fase líquida a fase sólida y viceversa durante los procesos de congelación/descongelación, sin embargo la eficacia de los crioprotectores está limitada por los efectos tóxicos de estos agentes⁵⁰ por ello la cantidad de crioprotector que se debe emplear es la mínima necesaria para optimizar las posibilidades de supervivencia de las células^{2,51}. Las investigaciones más recientes en congelación de semen equino se basan en buscar crioprotectores alternativos menos tóxicos.

Tradicionalmente los agentes crioprotectores han sido clasificados como internos o externos según su capacidad de penetrar en las células⁵².

Los crioprotectores externos

(Lactosa, manosa, trehalosa, metilcelulosa, lipoproteínas de la yema del huevo) ejercen su acción crioprotectora en el medio externo, favoreciendo la deshidratación de los espermatozoides y en consecuencia disminuyendo la probabilidad de que se formen grandes cristales de hielo en el interior de la célula, aumentan el porcentaje de agua sin congelar a bajas temperaturas y disminuyen la concentración de sales en los canales de agua²; algunos (sucrosa, trehalosa) son capaces además de estabilizar también las membranas durante los procesos de congelación⁵³. La yema de huevo y los fosfolípidos de bajo peso molecular contenidos en la leche parece que ejercen su acción crioprotectora minimizando la pérdida de lípidos^{21,49,54} que ocurre durante los procesos de refrigeración y congelación.¹¹

Los crioprotectores internos

Como el dimetilsulfóxido (DMSO) y las amidas (acetamida, formamida y sus derivados) son capaces de atravesar la membrana actuando a nivel del citoplasma, reemplazando el agua intracelular y disminuyendo el estrés osmótico producido por la deshidratación, manteniendo el volumen y disminuyendo el punto de congelación; el DMSO permite que las membranas se fundan (alrededor de 0°C) previniendo la difusión de los cationes y componentes citoplásmicos a través de los poros de las membranas formados por los cristales del hielo.⁵⁵

El crioprotector más ampliamente utilizado en la congelación del semen equino es el glicerol², este actúa a nivel intra y extracelular; en el medio interno mantiene la integridad de las proteínas previniendo la desnaturalización de las membranas⁵⁶ pero también disminuyendo la fluidez²¹ y en el medio externo aumenta la osmolaridad favoreciendo así la deshidratación celular, aumenta el porcentaje de agua sin congelar a bajas temperaturas, disminuye la concentración de sales en el medio externo y aumenta el tamaño de los canales de agua descongelada².

Está demostrado que el glicerol es tóxico para las células espermáticas de caballo si se emplea a altas concentraciones⁵⁷ e incluso posee efectos negativos sobre la fertilidad en las yeguas⁵⁸; gran parte de sus efectos tóxicos se deben al daño osmótico, al ser un compuesto de muy baja permeabilidad induce grandes movimientos de agua entre el medio intra y extracelular a su paso a través de la membrana lo que se traduce en cambios en la forma celular.³

Una forma de minimizar estos efectos tóxicos es mediante la utilización de con-

centraciones de glicerol lo más pequeñas posibles. El equipo de Vidament estudiando varias proporciones de glicerol (entre 1.5 - 4.5%), encontraron un aumento visible, aunque no significativo, en la motilidad del semen descongelado de caballo cuando utilizaban concentraciones entre 2.4 y 2.8% de glicerol.⁵⁹

En los últimos años se han empleado en la especie equina crioprotectores de bajo peso molecular y de mayor permeabilidad de membrana que el glicerol (crioprotectores alternativos). De entre los compuestos más utilizados podemos citar el etilenglicol, dimetil-sulfoxido (DMSO), propandiol, eritritol y diferentes amidas.^{2,58,60,61,62,63,64,65,66,67}

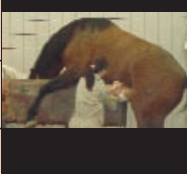
Los primeros datos sobre fertilidad de semen equino descongelado con algunos de estos crioprotectores, como el etilenglicol, indican una fertilidad en yeguas de entre el 60% y el 80%^{60,61}. El equipo de Alvarenga cuando emplean una concentración del 5% de etilenglicol observan que los espermatozoides mantienen las mismas características cinéticas e integridad del acrosoma que con glicerol, así como similar capacidad de unión a la membrana perivitelina de pollo^{60,61,66}. Otros autores también concluyen que el etilenglicol posee características crioprotectoras similares al glicerol.^{63,68}

Landim-Alvarenga observó que espermatozoides congelados con DMSO exhibían un descenso significativo de la MT y MP con respecto a los congelados con glicerol pero obtuvieron el mismo porcentaje de vivos y de espermatozoides con el acrosoma intacto que con glicerol. Diferentes autores describen un 78% de fertilidad con semen equino descongelado con 1M de DMSO⁶⁹.

Graham evaluó el uso de varias amidas como son la formamida, metilforma-

mida, dimetilformamida, acetamida y metilacetamida en la congelación de semen de caballo; emplea varias concentraciones de cada crioprotector y concluye que tanto la metilformamida (MF) como la dimetilformamida (DMF) protegen a los espermatozoides de caballo del daño por frío de forma tan eficaz como lo hace el glicerol pero al ser compuestos más permeables para la membrana plasmática, producen menor daño osmótico que el glicerol; por ello, son compuestos perfectamente válidos para ser utilizados en los procesos de congelación de semen de équidos siendo particularmente útiles en aquellos caballos cuyo semen normalmente no congela bien "bad freezers"⁵⁸.

Según Alvarenga y Graham los espermatozoides congelados con DMF mantienen las mismas características "in vitro" post-descongelación que aquellos congelados con glicerol^{61,58}. Graham afirma que las amidas pueden tener menos efectos negativos en la fertilidad que el glicerol al utilizarse en la inseminación de yeguas⁵⁸. En un estudio con DMF, MF, dimetilacetamida (DMA) y glicerol, se apreciaron ventajas al usar la DMF sola o en combinación con el glicerol frente al uso del glicerol como único crioprotector y en general se concluye que las amidas protegen mejor a las células espermáticas del daño por frío que el glicerol⁶⁴. En un estudio con semen de caballo de raza Mangalarga Marchador se emplean estos mismos crioprotectores obteniendo mejores resultados con DMF que con glicerol especialmente en caballos considerados "bad freezers"⁷⁰. El equipo de Vidament no encontró diferencias de motilidad, viabilidad y fertilidad entre el semen congelado con glicerol o con un 2% de DMF, lo que confirmaría que estos crioprotectores son una alternativa eficaz al uso del glicerol⁶⁵. De nuevo



en otro estudio de Alvarenga en el que compararon la calidad seminal post-descongelación de varias razas de caballos, se concluye que la DMF es más eficiente que el glicerol como agente crioprotector e incluso mejora la calidad seminal de sementales “bad freezers”⁶⁶.

La congelación de semen requiere un procesado que incluye una serie de pasos, sin embargo, existe una falta total de estandarización en los protocolos de congelación e inseminación entre los distintos laboratorios^{4,24,51}.

Dilución y centrifugación del semen:

El eyaculado de los équidos posee un gran volumen y una concentración relativamente baja en comparación con otras

especies; la centrifugación del semen nos permite eliminar la fracción de plasma seminal, reducir el volumen del eyaculado y aumentar su concentración para posteriormente diluirlo a una concentración determinada y en el medio adecuado para la congelación.⁵¹

Previamente a la centrifugación el semen tiene que ser diluido en un medio; los diluyentes empleados para la centrifugación son muy variados: Glucosa-EDTA⁷¹; citrato-EDTA con un gradiente de densidad de glucosa-EDTA⁷²; gradiente de Percoll⁷³; medio con leche y yema de huevo^{18,59} o HBS⁷⁴.

Varios laboratorios recogen sólo la fracción rica en espermatozoides del eyaculado^{75,76}; sin embargo algunos autores obtienen peores resultados cuando la comparan con la recogida completa y pos-

TABLA IV
Diluyentes empleados comúnmente para la centrifugación del semen equino

Compuesto	Glucosa-EDTA	Citrato-EDTA	HBS	Palmer 1984
Glucosa (g)	60	1.5	50	25
Citrato sódico (2H ₂ O) (g)	3.7	26	0.6	0.3
Citrato potásico (g)	-	-	0.82	0.4
EDTA disódico (g)	3.7	3.7	-	-
Bicarbonato sódico (g)	1.2	1.2	-	-
Lactosa (g)	-	-	3	1.5
Rafinosa (g)	-	-	3	1.5
Agua bidestilada (ml)	1000	1000	1000	500
Leche desnatada (ml)	-	-	-	500
Yema de huevo (%)	-	-	-	2
pH	6.5	7	7	-
mOsm/Kg	409	290	300-310	-

terior centrifugación del eyaculado⁵⁹. Blach y su equipo evaluaron los cambios producidos en la membrana acrosomal y las características cinéticas de los espermatozoides en las distintas fases de la congelación encontrando que los procesos de congelación y descongelación provocaron daños mucho más marcados que la centrifugación.⁷⁷

Diluyente de congelación:

Previamente a la congelación, el pellet o la porción del semen rica en espermatozoides (si se ha recogido con vagina abierta) se debe diluir en un diluyente de congelación que contenga crioprotectores, ajustando la concentración final según el número de espermatozoides necesarios en las dosis seminales.

El primer diluyente descrito con el que se consiguió el nacimiento de un potro vivo era leche entera con un 10% de gli-

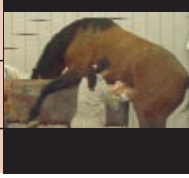
cerol⁷⁸. Actualmente la mayoría de los diluyentes de congelación empleados contienen una mezcla de sales minerales, azúcares, EDTA, yema de huevo y/o leche desnatada, además del crioprotector.

El diluyente Martín ó Lactosa-EDTA⁷¹ ha sido la base de la mayoría de los diluyentes empleados en la congelación de semen de caballo. Un autor chino² describe un diluyente que consiste en una solución de sacarosa al 11% con yema de huevo, leche desnatada y un 5% de glicerol; derivado de éste el diluyente Burns⁷⁹ es una mezcla muy rica en glucosa y sacarosa, leche desnatada y yema de huevo. Los franceses emplean un diluyente (INRA 82) compuesto de un 50% de una solución con azúcares (glucosa, lactosa y rafinosa) y sales minerales (citrato sódico y citrato potásico), un 50% de leche desnatada; un 2% de yema de huevo y un 2.5% de glicerol²². Heitland y

TABLA V
Diluyentes de leche y yema empleados en la congelación de semen equino

Componentes	Lactosa-EDTA	SM-EY	Burns
Glucosa (g)	-	2.7	0.9
Lactosa (g)	5.5	0.15	-
Glucosa-EDTA (ml)	25		
Rafinosa (g)	-	0.15	-
Sacarosa (g)	-	-	7.0
Citrato sódico (2H ₂ O) (g)	-	0.03	-
Citrato potásico (g)	-	0.04	-
Hepes (g)	-	0.7	-
Equex STM (ml)	0.5		
Leche desnatada (ml)	-	50	
Yema de huevo (%)	20.0	4.0	4.0
Glicerol (%)	5	4.0	3.0

Todos los componentes para 100 ml. de diluyente



su equipo lo modificaron añadiendo un tampón (HEPES), un 4% de yema de huevo y un 4% de glicerol y lo denominó SM-EY^{26,54,74}; este medio fue superior al Lactosa-EDTA según el estudio publicado en 1996.⁷⁴

Refrigeración y equilibración:

El tiempo transcurrido desde la suspensión de las células en el diluyente de congelación hasta el momento de la congelación se sitúa en unos 30 minutos^{71,72}. Para algunos autores este tiempo no produce ningún efecto en la motilidad post-descongelación del semen, aunque el semen se congele directamente desde los 20°C, se refrigere a 5°C en presencia de glicerol o se refrigere a 5°C añadiendo el glicerol a esta temperatura^{72,80}, esto podría deberse a que el efecto crioprotector ejercido por el glicerol es básicamente extracelular.²

Algunos diluyentes como el Lactosa-EDTA no necesitan una refrigeración del semen antes de la congelación^{51,74}; sin embargo, el método francés de congelación INRA 82¹⁸ contempla la dilución del semen, su refrigeración a 4°C durante una hora, centrifugación y finalmente la resuspensión en el medio de congelación con glicerol, equilibrándose en esta solución a 4°C durante 30 a 45 minutos antes de ser congelado. El equipo de Vidament con este mismo método obtiene buenos resultados de fertilidad en caballos, sea el semen refrigerado a 4°C antes o después de la centrifugación⁵⁹.

Envasado:

Los primeros sistemas de envasado usados en la congelación de semen equino fueron viales de vidrio², pastillas^{71,75} o tubos de aluminio^{76,81}; aunque en la actuali-

dad se envasa en pajuelas, bien sean macro o micropajuelas. La micropajuela o pajuela francesa tiene una capacidad de 0.5 ml⁸² y aporta mayor velocidad y uniformidad en la congelación^{51,60}. Recientemente se ha introducido el uso de pajuelas de 0.25 ml y ha comparado su uso frente a pajuelas de 4 y 0.5 ml; encontrando que la motilidad progresiva, la vitalidad y el test hiposmótico eran mejores en este formato.

Para algunos autores^{74,84} concentraciones muy elevadas son perjudiciales para la calidad postdescongelación del semen, en contra otros²⁶ no observaron diferencias en la motilidad del semen congelado a una concentración de 400 x 10⁶ ó 1600 x 10⁶ spz/ml, e incluso la fertilidad del semen congelado a la mayor concentración tendió a ser superior; en un estudio del equipo de Jasko⁸⁵ obtuvieron un índice de recuperación de embriones el día siete postovulación del 56% utilizando una sola pajuela de 0.5 ml con 800.10⁶ de espermatozoides.

Número de espermatozoides por dosis, concentración de las dosis y volumen de inseminación:

En caballos se ha establecido que 500.10⁶ de espermatozoides con motilidad progresiva cuando utilizamos semen fresco/refrigerado aseguran porcentajes de preñez óptimos, sin embargo se desconoce la dosis seminal mínima que asegura un buen índice de fertilidad al emplear semen congelado. Se ha documentado que las dosis seminales que contienen entre 150 y 350.10⁶ de espermatozoides con motilidad progresiva, inseminadas próximas a la ovulación, poseen altos niveles de fertilidad^{25,26}. El volumen de insemina-

ción varía en función del envase utilizado para la congelación y de la concentración del semen.

Congelación y almacenamiento:

Cuando la congelación se realiza sobre vapores de nitrógeno líquido, el ritmo de congelación varía según la altura a la que se coloquen las pajuelas sobre la superficie del nitrógeno líquido, siendo una velocidad generalmente alta de alrededor de $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$. Una vez que se alcanza la temperatura de -60°C las pajuelas pueden sumergirse directamente en nitrógeno líquido (-196°C)⁵¹.

En los congeladores automáticos, la temperatura de la cámara de congelación desciende y es mantenida mediante la introducción de vapor de nitrógeno líquido de forma programada, la mayoría de laboratorios equipados con congeladores programables usan un ritmo de congelación de $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre 20°C y -15°C y una segunda velocidad que varía de $-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre -15 y -120°C ^{4,18,77}. Distintos trabajos han comparado el uso de estos dos métodos de congelación sin encontrar diferencias entre ellos^{72,74}.

La evaluación del semen congelado se

puede realizar independientemente del tiempo que lleve almacenado en nitrógeno líquido^{4,15,74,82}, tampoco cambia su capacidad fecundante esté almacenado días o años^{15,75}.

Descongelación del semen:

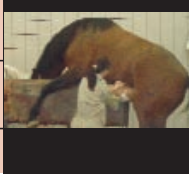
El proceso de descongelación es crucial para la supervivencia espermática; el ritmo o la velocidad a la que hemos de descongelar una muestra de semen va a depender de la velocidad de enfriamiento a la que fue sometida.³⁵¹ Por tanto el sistema de envasado y la velocidad de congelación nos va a determinar el protocolo de descongelación²⁴. El semen envasado en macropajuelas de 5 ó 2.5 ml es descongelado mediante inmersión en agua a 50°C durante 45 segundos^{4,71,74} mientras que el semen envasado en pajuelas de 0.5 ml es descongelado mediante inmersión en un baño maría a 37°C durante 30 segundos⁸² o a 75°C durante 7 segundos seguidos de al menos 15 segundos a 37°C ⁷².

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Para llevar a cabo la IA en el momento de máxima fertilidad es importante detectar el estro y monitorizar el desarro-

TABLA VI
Diferentes protocolos de descongelación de semen de caballo según tipo de envasado

Envasado	Descongelación	Tiempo
Pajuelas de 0.5 ml	37°C	Al menos 30 segundos
Pajuelas de 2.5 ml	50°C	45 segundos
Pajuelas de 4.0 ml	50°C	45 segundos



llo folicular; para ello se emplea principalmente la palpación rectal y la ecografía transrectal que nos permite evaluar los ovarios y el útero, determinando la presencia, el número y tamaño de los folículos en ambos ovarios. El hecho de poder determinar el momento de la ovulación nos va a permitir obtener una mayor eficiencia de la técnica de IA lo que se traduce en mejores resultados de fertilidad. Para ello podemos emplear tratamientos hormonales que nos permitan la inducción de la ovulación; mediante la administración de 2.500 UI de HCG por vía intravenosa, siempre a partir de la existencia de un folículo superior a 3,5 cm.

I.A. Semen Fresco:

En la mayoría de los programas de IA en yeguas, comienzan las inseminaciones cuando el folículo mide 3,5 cm y se repiten cada 48 horas hasta que se detecta la ovulación; con éste método deberemos lograr porcentajes de preñeces similares o incluso mayores a la conseguida con monta natural^{24,85}.

I.A. Semen Refrigerado:

Actualmente la IA con semen refrigerado es ampliamente utilizada en caballos con resultados muy satisfactorios⁶, pero hay que tener en cuenta la coordinación una serie de eventos: el celo y la ovulación en la yegua, la extracción del semen y el transporte del semen hasta la yegua. En la yegua los máximos porcentajes de preñeces se obtienen si la inseminación con semen refrigerado tiene lugar entre las 0 y 24 horas antes de la ovulación y ésta decrece si nos anticipamos entre 24 y 36 horas⁴⁶.

Si es posible se puede usar el mismo

protocolo de inseminación que con semen fresco, comenzar las inseminaciones cuando el folículo mida 3,5 cm y repetir cada 48 horas hasta que se detecta la ovulación; se ha comprobado que con éste método podemos lograr porcentajes de preñeces con semen refrigerado similares a los obtenidos con semen fresco.^{24,85}

En muchos casos este protocolo no es posible y tendremos que sincronizar la ovulación con la recogida y el transporte del semen, en la mayoría de los casos trabajaremos con otro veterinario. En este caso el protocolo utilizado por nuestro equipo es el siguiente:

- Avisar o nos avisan que la yegua está en celo y cuándo se prevé que se necesitará el semen (un margen normal es entre dos y tres días) nos informaremos o les informaremos del ritmo de recogidas de semen que siga ese semental, normalmente tres días en semana.
- Pediremos o extraeremos el semen cuando la yegua tenga un folículo superior a 35 mm.
- Inducimos la ovulación con hCG (2.500 U.I. IV) cuando nos confirmen que el semen está ya en camino.
- Inseminar cuando nos llegue el semen (el mismo día de la recogida o al día siguiente según la distancia que haya desde el semental a la yegua y el medio de transporte utilizado). Como la ovulación se produce entre las 36 - 48 h de la administración de la hCG, estamos consiguiendo que la yegua ovule entre 12 - 24 h tras la inseminación (optimizando las posibilidades de fertilidad). La aplicación de la hCG también se puede realizar en el



Inseminación con semen refrigerado.



Tanque de nitrógeno.

momento de la inseminación aunque el intervalo entre inseminación y ovulación será mayor.

- Confirmamos la ovulación al día siguiente y si no ha ovulado nos dará tiempo a pedir o que nos pidan semen de nuevo.

La refrigeración de semen a 4°C durante periodos de 24 a 36 horas se emplea rutinariamente en la cría equina con buenos resultados^{6,8,23,31,44}. Los resultados de nuestro laboratorio varían entre el 60 y el 90 % según el semental utilizado, obteniendo una media del 74% de fertilidad en los últimos cinco años.

I.A. Semen Congelado:

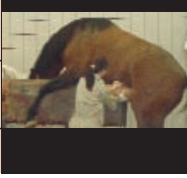
La inseminación artificial con semen congelado no es una técnica de fácil aplicación en la especie equina; hay que tener en cuenta una serie de factores que en definitiva van a determinar el éxito o el fracaso de dicha técnica, factores de entre los que podemos citar: la calidad seminal post-descongelación no siempre está relacionada con la fertilidad, el estado reproductivo de la hembra, el momento y fre-

cuencia de las inseminaciones y sobre todo su relación con el momento de la ovulación.

El primer potro nacido mediante la técnica de inseminación artificial con semen congelado fue descrito en 1957⁷⁸. El semen equino congelado-descongelado mediante las diferentes metodologías descritas pierde en gran parte su capacidad fecundante, el porcentaje de fertilidad de las yeguas inseminadas con semen equino descongelado no supera el 50% según diferentes autores^{75,15,25,57,59,82,72,85}.

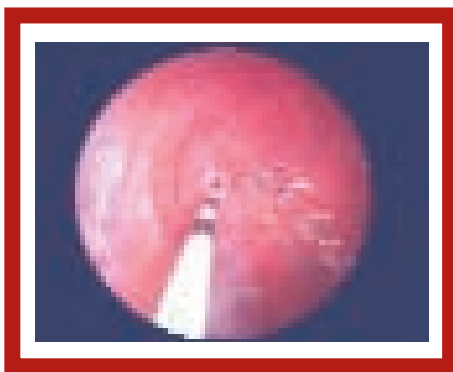
Existen una gran variedad de protocolos de inseminación con semen descongelado en équidos; los mejores resultados se obtienen cuando las yeguas son inseminadas dentro de las 24 horas previas a la ovulación o de las 6 horas post-ovulación²⁷.

Los últimos trabajos realizados en inseminación en caballos se han realizado utilizando la inseminación intrauterina profunda ya sea mediante el uso de histeroscopia o mediante catéteres de inseminación diseñados específicamente para depositar el semen al final del cuerno uterino. En un principio se utilizó esta técni-



ca con el fin de aumentar la fertilidad de algunos sementales subfértiles o del semen congelado, pero después de muchos estudios se ha llegado a la conclusión de que la gran utilidad de la inseminación intrauterina profunda es la utilización de bajas dosis inseminantes, ya que sólo algunos estudios anecdóticos describen una subida de la fertilidad⁸⁶. Esta técnica incrementa la esperanza de conseguir una técnica comercial de inseminación con semen sexado.

Al igual que el equipo la Universidad de Davis⁸⁶, nosotros preferimos un catéter de inseminación que permita la introducción de una pajuela de 0,5 ml para la inseminación y también permita el uso de múltiples pajuelas de 0,5 ml sin tener que retirar el catéter (se requieren dos personas para llevar a cabo la maniobra). El catéter debe tener una longitud por lo menos de 65 cm y tener la flexibilidad adecuada para la inseminación intrauterina profunda.

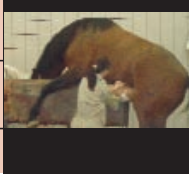


Inseminación intrauterina profunda por histeroscopia. El catéter se sitúa por encima de la papila del oviducto

BIBLIOGRAFÍA

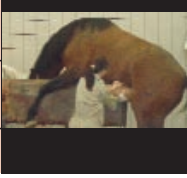
1. Foote, R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Am Soc Anim Sci* 2002; 1-10.
2. Amann, R.P.; Pickett, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Eq Vet Sci* 1987; 7: 145-173.
3. Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K.; Nolan, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl* 1990;11(1):73-88.
4. Samper JC, Morris CA. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 1998;49(5):895-903.
5. Holt, WV; Pickard, AR. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev Reprod* 1999;4:143-150.
6. Pickett, BW. Equine Reproduction VI. *Biol Reprod* 1995;1:547-564.
7. Allen, WR. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction in domestic animals* 2005;40:310-325.
8. Pickett, BW. y McKinnon, A.O. (ed.); Voss, J.L. (ed) Sexual behaviour. Factors affecting sperm production and output. Collection and evaluation of semen for artificial insemination. *Reproductive evaluation of the stallion*. En: *Equine reproduction*. Ed. McKinnon, A.O. y Voss, J.L. Lea & Febiger, Pennsylvania.1993.
9. Watson, PF. Artificial insemination

- and the preservation of semen. En Marshall's physiology of reproduction. Vol. 2: Male reproduction. Ed. G.E. Lamming, Londres. 1990
10. Amann, RP.; Graham, JK. Spermatozoal function. En: Equine Reproduction. Ed. McKinnon, A.O. y Voss, J.L. Lea & Febiger, Pennsylvania. 1993
 11. Pickett, BW.; Komarek, RJ. Effect of cold shock and freezing on loss of lipid from spermatozoa. *J Dairy Sci* 1996;50(5): 753-757.
 12. Drobnis, EZ.; Crowe, LM.; Berger, T.; Anchoroguy, TJ.; Overtreet, JW.; Crowe, JH. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. *J Exper Zool* 1993;265: 432-437.
 13. Hughes, JP; Loy, RG. Artificial insemination in the equine. A comparison of natural breeding and artificial insemination of mares using semen from six stallions. *Cornell Vet* 1970;60(3):463-75.
 14. Kenney, R.M.; Bergman, RV; Cooper, WL.; Morse, GW. Minimal techniques for breedings mares: technique and preliminary finding. *Procd. 21 st Ann. Conv. A.A.E.P.* 1975;5:21, 327-335
 15. Nishikawa, Y. Studies on the preservation of raw and frozen horse semen. *J Reprod Fertil* 1975;Suppl 23:99-104.
 16. Guay, P; Rondeau, M; Boucher, S. Effect of glycerol on motility, viability, extracellular aspartate aminotransferase release and fertility of stallion semen before and after freezing. *Equine Vet J* 1981;13(3):177-82.
 17. Magistrini M, Couty I, Palmer E. Interactions between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival. *Acta Vet Scand Suppl* 1992;88:97-110.
 18. Magistrini, M.; Vidament, M. L'insémination artificielle chez les équidés. *Rec. Méd. Vét. Spécial Reproduction des Equidés* 1992;959-966.
 19. Batellier F.; Duchamp, G.; Vidament, V.; Arnaud, G.; Palmer, E.; Magistrini, M. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh semen at 15 °C under aerobic conditions. *Theriogenology* 1998;50:229-236.
 20. Hecht., B.S.; Graham, J.K.; Squires, E.L. Cooling stallion sperm in modified boar semen extenders. *Anim Reprod Sci* 2001;68(3-4):135-365.
 21. Parks, J.E.; Graham, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992;38:209-222.
 22. Palmer, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem.* 1984;3, abstr. 377.
 23. Jasko, DJ.; Hathaway, JA.; Schaltenbrand, VL.; Simper, WD.; Squires, EL. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1992;37:1241-1252.
 24. Samper, JC. Equine Breeding management and artificial insemination. W.B. Saunders company. Ed. J. Samper. Pennsylvania. 2000



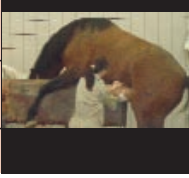
25. Vidament, M; Dupere, AM; Julienne, P; Evain, A; Noue, P; Palmer, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 1997;48(6):907-917.
26. Leipold, SD; Graham, JK; Squires, EL; McCue, PM; Brinsko, SP; Vanderwall, DK. Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology* 1998;49(8):1537-43.
27. Blanchard, TL.; Varner, DD.; Schumacher, J. *Manual of equine reproduction*. Ed. Mosby. St. Louis, Missouri. 1998
28. Jasko, DJ.; Martin, JM.; Squires, EL. Effect of insemination volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares. *Theriogenology* 1992;37: 1233-1239.
29. Bedford, SL.; Hinrichs, K. The effect of insemination volume on pregnancy rates of pony mares. *Theriogenology* 1994;42: 571-578.
30. Pickett, B.W.; Sullivan, J.J.; Byers, M.S.; Pace, M.M.; Remmenga, E.E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fert Steril* 1975;26:167-174.
31. Samper, J.C. Current techniques for artificial insemination. En: *Current therapy in Large Animal Theriogenology*. Ed. Youngquist, R.S. W.B. Saunders Co. Philadelphia. 1997
32. Brinsko, SP; Crockett, EC; Squires, EL. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 2000;54(1):129-136.
33. Dawson, GR; Webb, GW; Pruitt, JA; Loughin, TM; Arns, MJ. Effect of different processing techniques on motility and acrosomal integrity of cold-stored stallion spermatozoa. *J Eq Vet Sci* 2000;20(3):191-194.
34. Varner, D.D.; Blanchard, T.L.; Love, C.L.; García, M.C.; Kenney, R.M. Effects of seminal fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology* 1987;28:709-723.
35. Jasko, D.J.; Moran, D.M.; Farlin, M.E.; Squires, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology* 1991;35 (6):1059-1067.
36. Keller, A.; Malschitzky, E.; Hött, A.; Vieira, M.J.; Mattos, R.; Gregory, R.M.; Mattos, R.C. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. *Anim Reprod Sci* 2001;68(3-4):135-365
37. Kayser, J.P.; Amann, R.P.; Shideler, R.K.; Squires, E.L.; Jasko, D.J.; Pickett, B.W. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1992;38:601-614.
38. Moran, DM; Jasko, DJ; Squires, EL; Amann, RP. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1992;38(6):999-1012.
39. Province, CA; Squires, EL; Pickett, BW; Amann, RP. Cooling rates,

- storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology* 1992;23(6):925-934.
40. Douglas-Hamilton, D. H.; Osol, R.; Osol, G.; Driscoll, D.; Noble H. A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology* 1984;22(3):291-304.
 41. Varner, DD; Blanchard, TL; Love, CL; Garcia, MC; Kenney, RM. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology* 1988;29(5):1043-1054.
 42. Varner, D.D.; Blanchard, T.L.; Meyers, P.J.; Meyers, S.A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 24°C. *Theriogenology* 1989;32:515-525
 43. Amann, R.P., Jasko, D.J.; Kayser, P.; Moran, D. The responses of spermatozoa to cooling and rates of cooling. En: *Techniques of Handling and Utilization of Transported Equine Spermatozoa and Embryos. 1992 Proceedings. Colorado State University.*
 44. Batellier, F; Vidament, M; Fauquant, J; Duchamp, G; Arnaud, G; Yvon, JM; Magistrini, M; Squires, EL. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci* 2001;68(3-4):181-190.
 45. Serres, C. (2004). Evaluación y conservación del semen en el asno Zamorano-Leonés. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España.
 46. Pickett BW; Amann, RP. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. *Equine Vet Sci* 1987;7(5):289-302.
 47. Francl, AT.; Amann, RO. Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20°C. *Theriogenology* 1987;27(3):517-525.
 48. Parrish, JJ; Foote, RH. Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. *Biol Reprod* 1986;35(2):253-7.
 49. Graham, J.K.; Foote, R.H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 1987;24:42-52.
 50. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* 1986;3(1):1-13.
 51. Graham, JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1996;12(1):119-130.
 52. Meryman, HT. Cryoprotective agents. *Cryobiology* 1971;8:173-183.
 53. Anchordoguy, TJ.; Rudolph, AS.; Carpenter, JF.; Crowe, JH. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 1987;24(4):324-31.
 54. Heitland, A.V.; Jasko, D.J.; Graham, J.K.; Squires, E.L.; Amann, R.P.; Pickett, B.W. Motility and fertility of stallion spermatozoa cooled and frozen in a modified skim milk extender containing egg yolk and liposome. *Biol Reprod* 1995;1:753-759.
 55. Shier, WT. Studies on the mechanisms of mammalian cell killing by a freeze-thaw cycle: conditions that prevent cell killing using nucleated freezing. *Cryobiology*



- 1988;25 (2):110-20.
56. Baust, JG. Mechanisms of cryoprotection in freezing tolerant animal systems. *Cryobiology* 1973;10 (3):197-205.
 57. Pace, MM.; Sullivan, JJ. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *J Reprod Fert Suppl* 1975;23:115-121.
 58. Graham, JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Proceedings of the 14 th International congress on Animal Reproduction. Stockholm. 2000;2:307.*
 59. Vidament, M; Yvon, JM; Couty, I; Arnaud, G; Nguekam-Feugang, J; Noue, P; Cottron, S; Le Tellier, A; Noel, F; Palmer, E; Magistrini, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Anim Reprod Sci.* 2001;68(3-4): 201-18.
 60. Alvarenga, MA; Landim-Alvarenga, FC; Moreira, RM; Cesarino, MM. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging. *Equine Vet J* 2000;32(6):541-545.
 61. Alvarenga, MA; Graham, JK; Keith, SL; Landim-Alvarenga, FC; Squires, EL. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. *Proceedings of the 14 th International congress on Animal Reproduction. Stockholm. 2000;2: 57.*
 62. Graham, JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2000;12(1):119-130.
 63. Henry, M.; Snoek, PPN.; Cottorello, ACP. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology* 2002;58(2-4):245-248.
 64. Medeiros, ASL; Gomes, GM; Carmo, MT; Papa, FO; Alvarenga, MA; Evans, MJ. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 2002;58(2-4):273-276
 65. Vidament, M; Daire, C.; Yvon, JM.; Doliguez, P.; Bruneau, B.; Magistrini, M; Ecot, P; Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology* 2002;58(2-4):249-25.
 66. Alvarenga, MA.; Landim-Alvarenga, FC.; Papa, FO.; Leão, KM.; Medeiros, ASL.; Gomes, GM. Improvement of post-thaw stallion spermatozoa quality with the utilization of dimethyl formamide as a cryoprotector. *15th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil, 2004:500.*
 67. Serres, C.; Álvarez, AL.; Rodríguez, A.; Crespo, F.; Mateos, E.; Gómez-Cúetara, C. Use of ethylene-glycol in the cryopreservation of Zamorano-Leonés donkey semen. *IX Internacional Symposium on Animal Reproduction* 2004:512
 68. Keith, SL. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine semen. *Masters*

- Thesis, Colorado State University, Colorado, 1998.
69. Landim-Alveranga, F.C.; Alvarenga, M.A.; Graham, J.K.; Squires, E.L. Viability and ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with glycerol and DMSO. 3rd Int. Symp. Stallion Reprod. CSU, Fort Collins. CO. Abstracts, 2001: 61.
 70. Gomes, GM.; Jacob, JCF.; Medeiros, ASL.; Papa, FO.; Alvarenga, MA.; Evans, MJ. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology* 2002;58(2-4):277-279.
 71. Martin, J.C.; Klug, E.; Günzel, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J Reprod Fert* 1979;Suppl. 27:47-51.
 72. Cochran, JD; Aman, RP; Squires, EL; Pickett, BW. Fertility of frozen-thawed stallion semen extended in lactose-EDTA-egg yolk extender and packaged in 1.0-ml straws. *Theriogenology* 1983;20(6):735-741.
 73. Anderka, K.; Plante, C. The use of different processing treatments and their effect on post-thaw motility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1995;43(1):159.
 74. Heitland, A.V.; Jasko, D.J.; Squires, E.L.; Graham, J.K.; Pickett, B.W.; Hamilton, C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet J* 1996;28(1):47-53.
 75. Merkt, H.; Klug, E.; Krause, D.; Bader, H. Results of long-term storage of stallion semen frozen by the pellet method. *J Reprod Fert* 1975;Suppl. 23:105-106.
 76. Müller, Z. Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. *J Reprod Fert* 1987;Suppl.35:121-125.
 77. Blach, E.L.; Amann, R.P.; Bowen, R.A.; Frantz, D. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: Plasma membrane integrity and motion characteristics. *Theriogenology* 1989;31(2):283-298.
 78. Barker, C.A.V.; Gandier, J.C.C. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Can Med Vet Sci* 1957;21:45-51.
 79. Burns, PJ; Reasner, DS. Computerized analysis of sperm motion: effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 1995;5(9):377-380.
 80. Braun, J; Sakai, M; Hochi, S; Oguri, N. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology* 1994;41(4):809-818.
 81. Tischner-M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J Reprod Fert* 1979; Suppl.27:53-59.
 82. Loomis, PR; Amann, RP; Squires, EL; Pickett, BW. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. *J Anim Sci* 1983;56(3):687-693.
 83. Dell'aqua Jr., J.A.; Papa, F.O.; Alvarenga, M.A.; Zahn, F.S. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters



- of equine frozen semen. *Anim Reprod Sci* 2001;68(3-4):324-325.
84. Crockett, EC; Graham, JK; Bruemmer, JE; Squires, EL. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology* 2001;55(3):793-803
85. Jasko, D.J.; Moran, D.M.; Farlin, M.E.; Squires, E.L.; Amann, R.P.; Pickett, B.W. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. *Proc Am Assoc Equine Pract* 1992;649-660.
86. Ball B. A. (2004) Técnicas de inseminación histeroscópica y con dosis baja en el equino. *Recent Advances in Equine Reproduction*, Ball B.A. (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY. Documento.