

**ANÁLISIS DE TÉCNICAS DE CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO EMPLEADAS  
EN LA ACTUALIDAD. MONOGRAFÍA**



**Edison Darío Rangel Núñez**

**Universidad Antonio Nariño**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Bogotá, Colombia**

**2023**

**ANÁLISIS DE TÉCNICAS DE CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO EMPLEADAS  
EN LA ACTUALIDAD. MONOGRAFÍA**



**Edison Darío Rangel Núñez**

**10511714817**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de;**

**Médico Veterinario**

**Director**

**Sebastian Bonilla Correal**

**Universidad Antonio Nariño**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Bogotá, Colombia**

**2023**

**ANÁLISIS DE TÉCNICAS DE CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO EMPLEADAS  
EN LA ACTUALIDAD  
MONOGRAFÍA**

**Edison Darío Rangel Núñez**

**TRABAJO DE GRADO APROBADO**

Jurado 1

**Universidad Antonio Nariño**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Bogotá, Colombia**

**2023**

## Tabla de contenido

1. Introducción
2. Planteamiento del problema
3. Justificación
4. Objetivos
  - 4.1 Objetivo general
  - 4.2 Objetivos específicos
5. Metodología
  - 5.1 Materiales
  - 5.2. Búsqueda y revisión
    - 5.2.1 *Criterios de exclusión bibliográfica*
      - 5.2.1.1 *Tipos de estudios incluidos*
6. Marco teórico
  - 6.1 Selección de semental para muestras de semen
  - 6.2 Técnicas de recolección seminal
    - 6.2.1 *Vagina artificial*
    - 6.2.2 *Técnicas alternativas para recolección seminal*
      - 6.2.2.1 *Condón*
      - 6.2.2.2 *Manejo manual del pene*
  - 6.3 Valoración de muestra fresca
    - 6.3.1 *Propiedades del eyaculado*
      - 6.3.1.1 *Propiedades macroscópicas*
      - 6.3.1.2 *Propiedades microscópicas*
  - 6.4 Centrifugación
  - 6.5 Diluyentes
    - 6.5.1 *Composición de los diluyentes*
    - 6.5.2 *Crioprotectores*
      - 6.5.2.1 *Crioprotectores no permeables*
      - 6.5.2.2 *Crioprotectores permeables*
  - 6.6 Pre dilución y acondicionamiento
  - 6.7 Enfriamiento seminal
  - 6.8 Empajillado y sellado
  - 6.9 Criopreservación
    - 6.9.1 *Criopreservación con nitrógeno líquido manual*
    - 6.9.2 *Criopreservación mediante sistemas automatizados*
    - 6.9.3 *Descongelación*
  - 6.10 Área de mejoramiento
    - 6.10.1 *Coenzima Q10*
7. Discusión
  - 7.1 Recolección de las muestras seminales
  - 7.2 Propiedades seminales
  - 7.3 Diluyentes y criopreservantes
  - 7.4 Criopreservación y descongelación
8. Conclusiones
9. Bibliografías

## **Resumen**

La criopreservación seminal es una herramienta que permite la preservación y el almacenamiento de material genético por largos periodos de tiempo, sobre todo de machos genéticamente superiores, facilitando la labor de la inseminación artificial ya que el semen equino presenta una baja motilidad y un alto porcentaje de células espermáticas anormales, sumado a que son pocos los sementales que responden bien a la congelación seminal, algunas de las causas de la mala respuesta a la criopreservación son los crioprotectores usados, la permeabilidad de la membrana espermática, la carga microbiana presente en el eyaculado, los factores genéticos. Los espermatozoides son sometidos a diferentes riesgos en el proceso de congelación, como la temperatura, osmolaridad que pueden generar daño en la estructura de la membrana celular y estrés osmótico, lo que genera un aumento en la permeabilidad celular lo que conlleva a la entrada de agua, iones y crioprotectores. El objetivo de esta recopilación bibliográfica es reconocer las diferentes técnicas de congelación, avances, falencias con el fin de mejorar el resultado que se puede obtener tras emplear protocolos de criopreservación seminal.

**Palabras clave:** Criopreservación, congelación de semen, semen equino.

## **Abstract**

Semen cryopreservation is a tool that allows the preservation and storage of genetic material for long periods of time, especially of genetically superior males, facilitating the work of artificial insemination since equine semen has low motility and a high percentage of abnormal sperm cells, added to the fact that there are few stallions that respond well to seminal freezing, some of the causes of the poor response to cryopreservation are the cryoprotectants used, the permeability of the spermatid membrane, the microbial load present in the ejaculate, genetic factors. Spermatozoa are subjected to different risks in the freezing process, such as temperature, osmolarity, which can cause damage to the structure of the cell membrane, and osmotic stress, which generates an increase in cell permeability, which leads to the entry of water, ions and cryoprotectants. The objective of this bibliographic compilation is to recognize the different freezing techniques, advances, shortcomings in order to improve the result that can be obtained after using seminal cryopreservation protocols.

**Keywords:** Cryopreservation, semen freezing, equine semen.

## 1. Introducción

Smith y Polge congelaron semen en 1950, llegando en aquel entonces a una supervivencia del 25% de los espermatozoides que fueron llevados a una temperatura de  $-79^{\circ}\text{C}$ , en una solución con glucosa y glicerol, años más tarde se describió el primer nacimiento de un potro con semen congelado. Desde aquel entonces se ha investigado cada vez más sobre la criopreservación de semen equino, ya que supone grandes ventajas, aun con la falta de estandarización que se presenta en la metodología de procesado e inseminación, así como en los criterios y métodos estándar de evaluación de la calidad seminal pre y post descongelación (Castro y Chacón, 2016).

En 1987 Amann y Pickett postulaban que cada individuo requiere un protocolo diferente. Por tal motivo los laboratorios de congelación seminal en la actualidad han adaptado un mecanismo que se denomina (prueba de congelación), que consiste en evaluar cada nuevo semental al momento de incorporarlo en un proceso de criopreservación seminal para así generar mayores tasas de fertilidad (Gutierrez, 2014).

La metodología analiza uno o varios eyaculados del semental para que sean procesados con varios protocolos (incluyendo el uso de diferentes diluyentes de congelación) con el fin de determinar con cuál de ellos el equino puede generar muestras post congelación de mejor calidad (Wernli, 2010).

La criopreservación de espermatozoides ha facilitado el comercio nacional e internacional del semen equino, además de ayudar a mitigar la propagación de patologías venéreas, permitiendo a su vez la inseminación de varias yeguas con el semen proveniente de un solo eyaculado. Sin embargo el semen descongelado tiene una calidad inferior en relación al semen refrigerado o fresco lo cual se evidencia con tasas de preñez menores (Acosta, Camacho, Domingo, Pérez y Restrepo, 2017).

Las espermatozoides congelados pierden su integridad y la función de la membrana plasmática se ve alterada atribuido al choque térmico, al estrés osmótico, al estrés oxidativo, a la formación de cristales de hielo y a la apoptosis (Castro y Chacon, 2016).

Por tal motivo se buscan herramientas que reduzcan al máximo los procesos degenerativos ocasionados por la congelación como el uso de diluyentes con componentes que proporcionen al espermatozoide los suplementos necesarios para su sobrevivencia y protección al frío, además de un adecuado manejo de la fuerza de centrifugación como de las curvas de congelación y descongelación (Álvarez, Lozano y Gil, 2011).

## 2. Planteamiento del problema

El semen equino congelado presenta menor viabilidad respecto a otras especies, lo cual se debe principalmente a factores propios del equino o a la variabilidad individual que presenta cada reproductor, sumado a que los machos reproductores son seleccionados por su rendimiento en diversas disciplinas ecuestres y no por su capacidad reproductiva, generando un reto cuando se trata de conservar y potencializar los genes de animales que representan un alto valor genético (Acosta, et al., 2017).

Generalmente el 20-30% de los sementales producen un semen con buena capacidad de congelación, considerados “buenos congeladores”, otro 40-60% aproximadamente, con capacidad aceptable (aunque se ve afectado negativamente por la criopreservación) y otro 20-30% de sementales producen semen que no es congelable en absoluto, “malos congeladores”. Esta limitante genera que la práctica de la inseminación artificial con semen criopreservado en los equinos esté menos extendida que en otras especies (Wernli, 2010).

La calidad seminal se ve afectada por una serie de factores relacionados a los espermatozoides y a los procesos por los cuales atraviesan cuando son colectados, acondicionados, congelados y descongelados. La evaluación macroscópica del semen es importante para evaluar cambios en el aspecto, olor, consistencia, volumen, pH, acompañado de un examen microscópico que se hace en búsqueda de anomalías en la motilidad, concentración, y morfología seminal, que de presentarse son indicadores para el descarte de las muestras obtenidas, puesto que la fertilidad resultante de estas no será la esperada (Valbuena, 2021).

La muerte celular no es un efecto exclusivo de la congelación o descongelación, que se presenta por el estrés térmico al que se enfrentan los espermatozoides, o los cambios osmóticos por alteraciones químicas y físicas en el ambiente intra o extracelular que alteran la estructura celular y fomentan la formación de cristales que son nocivos, sino también por el empleo de fuerzas de centrifugación inadecuadas que conlleva a estrés mecánico, el uso inadecuado de diluyentes que no le proporcionen a las células el medio correcto para su supervivencia frente a los cambios agresivos a las que son sometidas (Benjumeda y Gómez, 2017).

Con la información previamente descrita surge la interrogante ¿Cuáles son las técnicas de criopreservación de semen equino que se usan en la actualidad? que aporten información para

el mejoramiento de las prácticas de criopreservación y así establecer los puntos claves para la obtención de mejores resultados.

### **3. Justificación**

La inseminación artificial es un método reproductivo, que consiste en la selección de una muestra seminal previamente preparada y optimizada, para depositarla útero de la yegua sin la intervención del semental, con el objetivo de aumentar el potencial de los espermatozoides y las posibilidades de fecundación del óvulo, ofrece una serie de ventajas como: mejoras en la fertilidad, disminuye el riesgo de transmisión de enfermedades venéreas, facilita los programas de selección y mejoramiento genético, se evita la monta del macho en la yegua, se tiene mayor control sobre los procesos hormonales y fisiológicos de la gestación (Rodríguez, 2010).

Criopreservar semen es una herramienta complementaria a los protocolos de inseminación artificial, facilitando el transporte de pajillas a largas distancias, lo cual permite que no sea necesaria la movilización de los machos reproductores o de las hembras para la cópula, permite el servicio de varias hembras con el eyaculado de un macho, facilita el almacenamiento de semen por largos periodos de tiempo y su disposición en cualquier momento, respecto al semen fresco o refrigerado que sufren pérdidas de su integridad pasadas horas o días (Castro y Chacon, 2016).

El interés creciente del uso de semen criopreservado a impulsado la investigación y desarrollo de nuevas biotecnologías para la obtención de muestras seminales con mayor viabilidad, para su implementación en protocolos de inseminación o programas de mejoramiento genético, acompañado del estudio y desarrollo de mejores prácticas de congelación, sumado a la adicción de sustancias crioprotectoras que permitan al esperma tener mayor resistencia a la congelación y descongelación (Cazales, Costa y Estrade, 2020).

Teniendo en cuenta la información presentada, es importante realizar una recopilación de información que guíe a los lectores a entender cuales son las herramientas necesarias para el desarrollo de adecuadas prácticas de criopreservación de semen equino y la correcta implementación de las sustancias crioprotectoras para la obtención de semen con mayor viabilidad.

#### **4. Objetivos**

#### **4.1 Objetivo general**

- Analizar las técnicas de criopreservación seminal equina usadas actualmente.

#### **4.2 Objetivos específicos**

- Comparar la criopreservación manual con la automatizada y determinar cuál presenta mejores resultados.
- Establecer cuáles son los puntos clave del proceso de congelación que son determinantes para obtener resultados óptimos
- Realizar una recopilación bibliográfica que permita ampliar el concepto de la criopreservación seminal equina.

### **5. Metodología**

En el presente trabajo se recopiló una serie de datos por medio de la metodología de revisión sistemática, recopilando información actual, que permitieron la identificación de las técnicas de criopreservación más modernas.

Este es un estudio cualitativo bajo la modalidad transversal descriptiva en el cual se usaron fuentes bibliográficas en español, artículos científicos, revistas, libros, tesis.

## **5.1. Materiales**

- Libros de reproducción equina, medicina equina
- Buscadores específicos en internet como Google académico, etc.
- Artículos de revistas científicas y revisión de divulgación
- Bases de datos científicas como Scielo, Dialnet,, Pubmed, Science Direct, entre otras.
- Literatura gris

## **5.2. Búsqueda y revisión.**

Se realizó una búsqueda y revisión de literatura sobre los métodos de criopreservación seminal equina, se investigó toda la información a la que se tuvo acceso a través de buscadores online específicos, bases de datos, teniendo en cuenta las palabras clave que guiaban la búsqueda, estas son: Criopreservación, congelación de semen, semen equino.

### ***5.2.1 Criterios de exclusión bibliográfica***

Se tuvieron en cuenta algunos criterios para la exclusión de bibliografía tales como:

- El idioma, siendo excluidos trabajos que no fuesen en español o inglés.
- Año de publicación, revisando que fuesen mínimo del año 2005 en adelante.
- Legibilidad lingüística de los documentos.

#### ***5.2.1.1 Tipos de estudios incluidos***

Los estudios que se incluyeron para enriquecer la data del trabajo incluyen: estudios descriptivos, correlacionales, explicativos, longitudinales, experimentales, estos con el eje central de reproducción equina y criopreservación.

## **6. Marco teórico**

### **6.1. Selección de semental para muestras de semen**

Al elegir un semental para recolecta de semen se debe evaluar que no presente ningún tipo de patología, y se debe tener en cuenta la genética, características fenotípicas que se desean transmitir. La época del año influye en el rendimiento del caballo, ya que en temporadas de invierno se debe esperar una disminución en la calidad seminal, aunque este problema se presenta en mayor parte en países estacionales, ya que Colombia cuenta con un clima tropical esto no supone un problema de gravedad. Los equinos que tienen un alto rendimiento sexual no van a tener la misma concentración espermática que los que tienen un reposo adecuado (Castro y Gonzalez, 2019).

## **6.2. Técnicas de recolección seminal**

Actualmente el semen se recolecta mediante vaginas artificiales, haciendo que el caballo monte sobre una yegua o maniquí. Aunque no siempre se puede obtener el eyaculado de esta forma, para lo cual existen otras alternativas, se puede recolectar con vagina artificial en el suelo, mediante estimulación manual del pene, mediante condón (Serres, 2012).

### ***6.2.1. Vagina artificial***

Es un instrumento que pretende simular las condiciones naturales de la vagina equina, en particular: temperatura, presión y lubricación, para así estimular al semental a eyacular cuando éste introduce el pene en el artefacto (Alarcon, Bravo y García, 2012).

Existen diversos modelos de vagina artificial, con ligeras variaciones, todas intentan imitar las condiciones mencionadas. Son cilindros rígidos o flexibles con una cubierta interna del mismo o diferente material (usualmente látex) que crea una cámara dentro de la cual se introduce agua caliente para llegar a las condiciones idóneas de temperatura y presión. El lubricante se debe poner en el primer tercio de la vagina artificial para lograr que el pene no tenga fricción que lo pueda lastimar y a su vez para evitar que este entre en contacto con el semen (Saltos, 2009).

La temperatura al interior de la vagina debe oscilar entre 40 a 47°C, al final de la vagina se ubica el recipiente de recogida, los más usados son los de plástico. Es relevante que este recipiente tenga una temperatura entre 36 a 38°C para evitar que los espermatozoides entren

en un shock térmico, y se debe evitar que entre en contacto con luz solar directa para salvaguardar a las células espermáticas (Estévez, Garcia y Gispert, 2018).

La recogida de semen con vagina artificial se puede lograr con el semental montado sobre yegua, maniquí o en el suelo. La monta se debe realizar en hembras en celo natural o inducido, se debe hacer una preparación adecuada, trabandola, recoger su cola para así evitar suciedad y lesiones sobre el pene. El tamaño de la yegua se debe adaptar al del caballo y debe tener la suficiente fuerza para soportar el peso del semental (Restrepo, Ocampo y Velásquez, 2013).

El uso del maniquí se extiende cada vez más, algunos llevan la vagina artificial incorporada, la altura de estos debe ser regulable. El semental requiere un tiempo de aprendizaje para montar sobre el aparato y regularmente con una yegua en celo que estimule al reproductor. Debe haber buena relación entre el colector que lleva la vagina y quien maneja el semental para evitar accidentes y realizar la tarea eficientemente (Aznarán, 2019).

La vagina debe mantenerse horizontal, de manera que se asemeje a la cópula fisiológica, el agua de la vagina artificial debe retirarse de la vagina a tal punto que se acomode al tamaño del pene, posterior a la eyaculación el caballo desciende, este debe ser acompañado con la vagina mientras la erección se desvanece, al tiempo que se termina de vaciar el agua restante para retirar con mayor facilidad la vagina. El semen recolectado se debe llevar en seguida al laboratorio para su procesamiento, dilución y análisis (Rodríguez, 2009).

## ***6.2.2 Técnicas alternativas para recolección seminal***

### ***6.2.2.1 Condón***

Algunos sementales acostumbrados a monta natural, rechazan la recogida de semen con vagina artificial, por lo cual el uso de condón de látex resulta útil, permitiendo la monta natural. Posterior a la eyaculación, cuando el pene sale de la vagina se debe retirar el condón (Boeta, Díaz y Hayen, 2013).

### ***6.2.2.2 Manejo manual del pene***

La manipulación manual del pene debe ser realizada por alguien con destreza para esta labor, sin necesidad de ningún equipamiento especial, y se puede realizar sin presencia de yegua, con el uso de un maniquí o en el suelo. Los caballos a los que se realiza esta técnica deben ser tranquilos y estar acostumbrados a la manipulación (Restrepo, Ocampo y Velásquez, 2013).

#### ***6.2.2.3 Colecta en suelo***

De utilidad para animales que poseen problemas motores que les complican la monta o en animales sin problemas aparentes que no montan la yegua pero muestran erección cuando la ven (Rvet, 2018).

#### ***6.2.2.4 Recolecta de semen epididimario***

Útil en caballos con problemas obstructivos de las vías genitales posteriores al epidídimo o en caballos que murieron recientemente, la colecta se puede hacer en la cola o la porción distal del cuerpo del epidídimo. Generalmente el semen recolectado posee una calidad aceptable para congelar, este procedimiento se debe realizar con experticia (Serres, 2012).

### **6.3 Valoración de muestra fresca**

Al obtener el eyaculado, se debe filtrar el semen para retirar la fracción de gel que posee una concentración baja de espermatozoides, pudiéndose realizar mediante aspiración con agujas estériles, filtración mediante un sistema incorporado a la vagina artificial, permitiendo eliminar residuos. Posteriormente se evalúan características macro y microscópicas del semen (motilidad, morfología, concentración, bacteriología), los equipos e instrumentos usados para la recolección de semen deben estar a una temperatura de 37°C para evitar choque térmico (Restrepo, Rojano y Úsuga, 2013).

#### ***6.3.1 Propiedades del eyaculado***

##### ***6.3.1.1 Propiedades macroscópicas***

Se observan las características macroscópicas del semen recién recolectado que pueden dar indicios de su calidad para congelación (Buzón, 2013).

- ***Volumen***

Evaluar el volumen del eyaculado es importante en la determinación de la fertilidad. El volumen normal que producen los sementales varía entre individuos, pudiendo producir de 30 - 250 ml, aunque la mayoría de sementales producen 100 ml, de los cuales de 20 - 40 ml son constituidos por la fracción de gel (Dutra, Graglia y Martinez, 2013).

- ***Aspecto***

El aspecto de un semen fresco debe presentar un color de blanco a grisáceo y la consistencia a de ser acuosa o un tanto gelatinosa. es importante evaluar este parámetro para lograr identificar si el semen recolectado puede tener cambios en su color que pueden estar asociados a detritos, hemospermia o urospermia que se detecta además por el olor a orina en el semen, estos cambios pueden afectar la calidad de semen y ser indicativos de problemas en el tracto reproductivo o urinario (Valbuena, 2021).

- ***pH***

La relación del pH y concentración espermática es inversamente proporcional de tal forma que a altas concentraciones el pH tiende a ser menor y viceversa. El semen del equino varía de 7,2 a 7,6. Es importante realizar la medida del pH lo más pronto posible, ya que se que pasado el tiempo se puede generar ácido láctico (Castro y Gonzalez, 2019).

### ***6.3.1.2 Propiedades microscópicas***

- ***Motilidad***

La motilidad se estudia con el eyaculado recién colectado, ya que este parámetro se ve alterado por la temperatura, además que pasado el tiempo se presenta una pérdida de la motilidad progresiva, por tal motivo se debería hacer la evaluación antes de los 5 minutos post colecta. Se evalúa tanto en semen fresco como diluido. Se suele preferir evaluar muestras diluidas ya que el semen puro tiende a aglutinarse, esta dilución se

debe realizar en un medio adecuado, a una concentración constante entre 25 y 50 x 10<sup>6</sup> spz/ml (Pineda y Pinilla, 2007).

La evaluación seminal es una estimación subjetiva, y se debe tener en cuenta el porcentaje de células mótils o motilidad total. Para el estudio de motilidad se pueden usar tinciones como la eosina nigrosina, que es una tinción que ayuda en esta labor. Con la observación de la motilidad se evalúa la viabilidad del espermatozoide en busca de la existencia de anomalías morfológicas y la concentración de espermatozoides en la muestra observada (Benjumeda y Gómez, 2017).

- ***Morfología***

Se evalúa si los espermatozoides presentan alteraciones morfológicas, para lo cual se usan sustancias buferadas en formol o por tinción. Las tinciones que más se usan son eosina-nigrosina, Giemsa o Diff quick. Se clasifican las anomalías morfológicas en: Primarias, que se asocian con defectos en la espermatogénesis de origen testicular; Secundarias, que se asocian a conductos extra testiculares y Terciarias, que se desarrollan in vitro, como consecuencia de una colecta errónea o un manejo del semen inapropiado (Gonzalez, Herrera, Rodriguez y Vargas, 2015).

- ***Concentración***

Esta se determina a través de espermatozoides por unidad de volumen. Se puede medir la concentración por medio de recuento en cámara de Neubauer o por espectrofotómetro. Para el conteo en cámara de Neubauer se puede usar una dilución de 1:20 o 1:40 en solución fijadora de formol-salina o Hayem. El cálculo de la concentración espermática es importante ya que esto permite determinar la dosis inseminante correcta, o para calcular el volumen de las muestras para los diferentes ensayos (Dutra, Graglia y Martinez, 2013).

## **6.4 Centrifugación**

Se realiza con el fin de separar el plasma seminal del eyaculado y concentrar los espermatozoides y remover plasma seminal que tiene efectos nocivos sobre la motilidad

espermática, esto permite realizar diluciones con mayor facilidad, se usan tubos de ensayo graduados con capacidad de 10, 15 o 50 ml, a pesar que la centrifugación es un paso necesario en el proceso de congelación seminal puede conllevar a peroxidación lipídica de membranas espermáticas (Wernli, 2010).

Por tanto es preferible emplear fuerzas de centrifugación leves (400 a 600 g) por 15 minutos se reduce el daño a las células y la fertilidad seminal mejora en el proceso de refrigeración (Checa, 2018).

La densidad que tienen los espermatozoides es diferente al de los componentes del eyaculado como: células epiteliales, leucocitos, bacterias y detritos lo que facilita su separación de estos, los espermatozoides móviles se dirigen en dirección de la fuerza de centrifugación (Cantero, Montoya y Restrepo 2016).

## **6.5 Diluyentes**

Uno de los primeros diluyentes que se tiene registro es la leche entera con 10% de glicerol con el cual se logró el nacimiento de un potro vivo. Los diluyentes son sustancias que aumentan la viabilidad de los espermatozoides recién colectados o criopreservados, contienen azúcares, tampones, antibióticos, yema de huevo y leche descremada, además deben proporcionar una presión osmótica y pH estables, aportar nutrientes y sustancias que protegen a los espermatozoides de las bajas temperaturas a las cuales son sometidos (Celis, et al., 2014).

El diluyente idóneo para la criopreservación de semen equino, es aquel que reduce el daño ocasionado por varios ciclos de congelación-descongelación y que aumentan la recuperación de espermatozoides móviles y viables, los diluyentes incrementan las tasas de sobrevivencia de los espermatozoides (Duque, Restrepo y Rojano 2016).

La contaminación bacteriana que se puede presentar por la recolección seminal, se trata de contrarrestar con los antibióticos presentes en los diluyentes así mismo logrando la disminución de los riesgos que se asocian a la transferencia de patógenos, de los antibióticos más usados para retardar o eliminar el crecimiento bacteriano son la penicilina G-potásica, la Gentamicina o Amikacina y la estreptomycinina (Duque, Restrepo y Rodriguez, 2016).

La sustancia diluyente se puede preparar o adquirir una presentación comercial que generalmente ya contienen antibióticos, para ambos casos es necesario contar con agua bidestilada que dependiendo de la presentación utilizada, el porcentaje de agua que se agrega varía, estos deben mantenerse refrigerados, deben contar con el mismo pH del semen que se desea diluir, si se presentan pH diferentes se pueden emplear hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) al 5 %, para alcalinizar o acidificar respectivamente (Montoya, 2016).

### ***6.5.1 Composición de los diluyentes***

Los diluyente generalmente se componen de carbohidratos de simples como lactosa, glucosa, rafinosa que aportan energía a las células seminales, sales de Hanks que permiten la viabilidad de las células, citrato de sodio, citrato de potasio que pueden servir para reducir la acidez del pH, HEPES que funcionan como sustancias tampón, penicilina, gentamicina, que mantienen la carga microbiana baja, leche descremada que aporta lipoproteínas de baja densidad que le proporcionan estabilidad a la membrana celular del espermatozoide, fosfolípidos provenientes de la yema de huevo o de la lecitina de soya. Estas sustancias pueden ser usadas para semen fresco o criopreservado (Celis, et al., 2014).

### ***6.5.2 Crioprotectores***

Son sustancias hidrosolubles que reducen el punto eutéctico de la solución a la que se incorporan. El punto eutéctico es la máxima temperatura a la que se puede producir la mayor cristalización de la solución. La reducción del mismo genera una mayor deshidratación de los espermatozoides, generando un gradiente osmótico menor, por lo cual la célula queda protegida (Landivar, Pesántes, Ramón y Rodríguez, 2017).

#### ***6.5.2.1 Crioprotectores no permeables***

Son compuestos que no atraviesan la membrana plasmática por su elevado peso molecular, generando el efecto protector en el medio extracelular, ya que favorecen un medio hipertónico que hace que salga agua de la célula (deshidratación), previniendo que se formen cristales de hielo intracelulares (Acosta, Avila, Delgado, Gómez, Leon, Lozano, Lopez Madero y Reguero, 2006).

- ***Azúcares***

El plasma seminal presenta de forma natural varios azúcares como la glucosa, fructosa y sorbitol. De los cuales la glucosa y fructosa son los más frecuentemente usados en diluyentes de congelación. El uso de azúcares como la metilcelulosa (Barrios, Huanca, Revuelta y Rodriguez, 2016).

- ***Leche descremada***

Aportan caseína, fosfocaseinato y beta lactoglobulinas que generan una función protectora frente al estrés por frío (Sandoval, 2010).

- ***Yema de huevo***

Las lipoproteínas y fosfolípidos que contiene la yema de huevo son componentes que presentan una función protectora frente al daño ocasionado por la congelación, generalmente usado huevo de gallina, aunque se han reportado buenos resultados con huevo de otras especies como patos (Castro y Chacon, 2016).

Existen diluyentes comerciales que contienen fosfolípidos provenientes de la lecitina de soya, mientras que otros no contienen este componente, por tal motivo se adiciona la yema de huevos frescos, generalmente limpiando previamente los huevos y utilizando separadores de yema, retirando los excesos de clara con papel filtro (Pineda y Pinilla, 2007).

#### ***6.5.2.2 Crioprotectores permeables***

Son compuestos permeables a través de la membrana plasmática gracias a su bajo peso molecular, produciendo una reorganización de los compuestos lipídicos y proteicos de la membrana que facilita la fluidez, generando que la deshidratación sea más fácil a bajas temperaturas y disminuyendo la formación de cristales intracelulares, incrementando la supervivencia espermática a la criopreservación actuando en el medio extra e intracelular (Elgueta, 2018).

- ***Glicerol***

Es una sustancia crioprotectora, a pesar que no existe uniformidad en cuanto a su concentración óptima en los diluyentes comerciales equinos, generando un efecto negativo en la motilidad y fertilidad post-descongelación. Su efecto tóxico causa alteraciones citoplasmáticas, provocando a su vez desnaturalización de proteínas. El principal efecto tóxico puede estar desencadenado por el estrés osmótico producido durante su incorporación y eliminación en las fases de congelación y descongelación (Arriaga, Ampuero, Huanca y Terreros, 2015).

- ***Dimetil sulfóxido***

Es un agente crioprotector que gracias a su bajo peso molecular (78.13 g/mol) le permite atravesar la membrana celular de forma rápida, evitando que se produzcan cristales intracelulares en el proceso de criopreservación celular (Lopez, 2021).

### ***6.5.2.3 Comparación de diluyentes***

#### ***Equipro® y Gent®***

En 2014 se compararon dos diluyentes Equipro® y Gent®, para criopreservación seminal de caballo criollo colombiano, se tuvieron en cuenta los eyaculados con una motilidad progresiva mínima del 70% y concentración de 100 millones de espermatozoides por mL, el diluyente Equipro® se suplemento con 5% de dimetilformamida y 4% de yema de huevo, se procesaron las muestras mediante un protocolo de congelación rápida y en la descongelación se evaluaron los parámetros de: motilidad total, motilidad progresiva, velocidad rectilínea, velocidad curvilínea, velocidad media, mediante un microscopio de contraste, la morfología y vitalidad espermática se establecieron mediante tinción de eosina-nigrosina fijados en una lámina, la integridad de la membrana también se evaluó mediante el uso de una combinación hipo-osmótica, para evaluar el hinchamiento celular. Los resultados obtenidos fueron: una mayor tasa de motilidad total para el diluyente Equipro®, siendo que los demás aspectos evaluados mostraron semejanza, y otros con grandes diferencias

como los indicadores de velocidad y desplazamiento que se atribuyen a efectos inherentes a la composición de los diluyentes (Celis et al., 2014).

### ***Comparación de cinco diluyentes comerciales***

En 2019 se comparó la viabilidad obtenida a partir de la congelación de semen epidídimo equino con el uso de cinco mezclas de diluyentes comerciales: INRA96 + INRA Freeze, BotuSemen + BotuCRIO, EquiPlus + Gent Freeze, EquiPlus + EquiPlus Freeze y Gent + Gent Freeze, se evaluó la motilidad total y progresiva post congelación siendo que los mejores resultados se presentaron con INRA96 + INRA Freeze y BotuSemen + BotuCRIO siendo atribuido la menor concentración de glicerol presente en estos, y los menos óptimos se presentaron con Gent + Gent Freeze, adicionalmente se determinó que los diluyentes que contengan proteínas de leche como: INRA96 + INRA Freeze, EquiPlus + EquiPlus Freeze son preferibles para una dilución inicial respecto a diluyentes que contengan yema de huevo (Bollweinb, Handler, Neuhauser y Siudab, 2019).

## **6.6 Pre dilución y acondicionamiento**

La predilución es un procedimiento que se realiza con el fin de acondicionar a los espermatozoides antes del proceso de congelación, se realiza agregando diluyente en una relación 1:1 con el eyaculado. El agua contenida en los espermatozoides va a ser reemplazada con el diluyente para que al momento de congelar no se generen los cristales intracelulares que pueden dañar la membrana plasmática generando la muerte celular, este proceso dura aproximadamente 45 minutos (Paredes, 2015).

## **6.7 Enfriamiento seminal**

Es indispensable enfriar el semen antes del proceso de congelación, esto genera poco o ningún efecto perjudicial sobre la célula espermática siempre y cuando se utilice el diluyente adecuado, la refrigeración genera efectos sobre la fertilidad, ya que los componentes de la membrana celular pueden alterarse por el rápido descenso de la temperatura, por tal razón el enfriamiento de los espermatozoides equinos debe tener un ritmo lento que le permiten a los lípidos y

proteínas de membrana reorganizarse previniendo daño a gran escala (Cardona, Gonzalez, Ospitia, Otero, Paredes y Perez, 2018).

La temperatura óptima de enfriamiento seminal va desde 4°C a 6°C para que se mantenga la motilidad y fertilidad espermática durante un tiempo aproximado de 3 a 4 horas (Pineda y Pinilla, 2007).

## **6.8 Empajillado y sellado**

Las muestras seminales se envasan en pajillas con la ayuda de una bomba de vacío que drenan el semen previamente diluido y lo lleva a una ‘flauta’ que es una herramienta de alimentación, la cual dosifica varias pajitas a la vez, o se puede hacer de forma manual con la ayuda de una jeringa llenando la pajilla y dejando una pequeña burbuja de aire que es donde se va a sellar la pajilla (Wernli, 2010).

Las pajitas vienen con diferentes volúmenes, por lo general las más utilizadas son de 0,5 ml, esto permite que el enfriamiento sea más uniforme y eficiente, a pesar que a veces se requieren varias pajillas para completar las dosis de inseminación, una vez las pajillas son llenadas se procede a sellar la pajilla, para esto existen diversos sistemas como: el polvo o alcohol divinílico el cual al entrar en contacto con el agua se plastifica, las microesferas, sellado por calor o presión (Paredes, 2015).

## **6.9 Criopreservación**

Los espermatozoides se enfrentan a una fase crítica en el proceso de criopreservación, esta ocurre

cuando las células seminales atraviesan las temperaturas de -15°C a -60°C, lo que puede generar daños nocivos en las células, una vez se supera ese umbral de temperatura, los espermatozoides cesan su actividad metabólica y se tornan células durmientes. El espermatozoide alcanza un estado de anabiosis al encontrarse en nitrógeno líquido -196°C, en este momento no hay paso de agua, ya que esta se encuentra en forma de cristales, esto genera una viscosidad alta y la difusión es prácticamente nula y no hay energía térmica para que ocurra una reacción química (Caldevilla, Ferrante y Neild, 2020).

Cuando se congela semen de manera rápida se genera una alteración conocida como (shock de congelación) y ocurre generalmente cuando se atraviesa por el intervalo de temperatura de 20°C a 1°C lo cual se evidencia con los espermatozoides realizando movimientos circulares, a su vez se presenta una pérdida de motilidad prematura, merma la producción de energía, se desprende el acrosoma espermático, la permeabilidad de la membrana celular aumenta generando pérdida de iones y moléculas intracelulares, lo cual se atribuye a formación de cristales de hielo intracelulares (Wernli, 2010).

Se sugiere que la viabilidad de los espermatozoides está ligada a las propiedades físicas del ambiente extracelular, teniendo en cuenta lo anterior se ha probado que al congelar una solución acuosa de glicerol, aumenta rápidamente la viscosidad y se generan núcleos de hielo, con este aumento del entorno viscoso se limita cada vez más la difusión del agua, lo cual favorece a que se formen cristales extracelularmente, capturando los solutos dentro de cámaras congeladas junto a las células, que se ven obligadas a estar rodeadas de una solución cada vez más concentrada que deshidrata las células, generando un desbalance osmótico cuando se descongelan (Elgueta, 2018).

### ***6.9.1 Criopreservación con nitrógeno líquido manual***

La criopreservación con nitrógeno líquido hace uso de una curva de congelación en la cual las pajillas tienen un descenso gradual de la temperatura, para garantizar que los espermatozoides no mueran en el proceso, se inicia ubicando las pajillas de forma horizontal a aproximadamente 4 a 6 cm por encima del nivel del nitrógeno durante 7 a 20 minutos, la congelación puede variar dependiendo de la altura a la que se coloca la pajilla, siendo generalmente rápida, posteriormente las pajillas se sumergen en el nitrógeno líquido, donde pueden ser almacenadas por tiempo indeterminado, generando una viabilidad del 30-35% post descongelación (Acosta, et al., 2017).

### ***6.9.2 Criopreservación mediante sistemas automatizados***

Los sistemas automatizados de criopreservación usan curvas de congelación que combinan diferentes velocidades, sometiendo las pajillas a ciertas temperaturas bajo 0 por minuto y así poder congelar el semen paulatinamente, posteriormente se sumergen las pajillas en nitrógeno líquido, La ventaja que ofrece este sistema es que las tasas de congelación son más uniformes

ya que se tiene control sobre la temperatura ofreciendo una mayor calidad post-descongelación respecto a la congelación con el sistema convencional, generando una viabilidad del 50% (Elgueta, 2018).

### **6.9.3 Descongelación**

Los protocolos de descongelación seminal, dependen del sistema de envasado y de la velocidad de congelación, usualmente se recomiendan protocolos de descongelación sumergiendo las pajillas en agua a 37° a 50°C dependiendo el volumen de la pajilla durante medio o un minuto, este proceso debe realizarse a una tasa muy rápida para disminuir la posibilidad de daños extracelulares producidos por la formación de cristales de hielo (Castro y Chacon, 2016).

## **6.10 Área de mejoramiento**

En el campo de la reproducción equina se buscan alternativas para optimizar las tasas de fertilidad, sobre todo, en el área de la criopreservación, la cual sigue dando bajos valores de viabilidad seminal, por tal motivo es de importancia el aprendizaje de nuevas técnicas de manipulación y conservación espermática (Gutierrez, 2014).

### **6.10.1 Coenzima Q10**

Es un lípido redox con función antioxidante, capaz de prevenir la peroxidación de lípidos al inhibir la formación de hidroperóxidos generando mejoras en la motilidad, refrigeración y subfertilidad seminal, además de fomentar la generación energética a través del intercambio de electrones y protones en la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial, las ventajas antioxidantes que ofrece la coenzima Q10 se aplican tanto en el momento de la congelación, descongelación y centrifugación (Elgueta, 2018).

## **7. Discusión**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la investigación realizada sobre las técnicas actuales de criopreservación de semen equino, se puede manifestar que al día de hoy no se han desarrollado muchas técnicas más allá de la congelación con nitrógeno líquido que parece ser la única herramienta que proporciona los resultados esperados para la criopreservación.

### **7.1 Recolección de las muestras seminales**

Es indispensable para los protocolos de criopreservación que la recolección seminal se realice con sementales reproductivamente aptos, excluyendo las variables que no aportan significativamente a las tasas de fertilidad. Siendo útil la implementación de protocolos de congelación con los individuos que se desean incluir, para hacer la validación de la calidad espermática y así determinar si el semen es viable para la congelación (Castro y Chacon, 2016).

### **7.2 Propiedades seminales**

Es importante la evaluación de las características macroscópicas del semen como: volumen, pH, aspecto y de las microscópicas como: la motilidad, concentración, morfología, ya que nos aportan indicios de la viabilidad que pueden tener los espermatozoides en colonias o individualmente, no se puede pasar por alto este proceso de identificación ya que puede ser más decisivo en el proceso de criopreservación que la propia congelación, ya que si se selecciona un semen de baja calidad, sumado a los efectos perjudiciales que genera la centrifugación y congelación a las células espermáticas, las tasas de fertilidad obtenidas al final, no van a ser nada rentables y se va a perder, tiempo, dinero, instrumentos e incluso la confianza que los clientes depositan en los operarios (Cazales, Costa y Estrade, 2020).

### **7.3 Diluyentes y criopreservantes**

La elección de semen de buena calidad no garantiza que el proceso de la congelación y descongelación va a mantener las células viables, por tal razón se debe vigilar cada etapa de la criopreservación, siendo la adición de diluyentes un paso importante, dado que estos aportan a los espermatozoides un entorno adecuado para su sobrevivencia, siendo que estos se van a enfrentar a condiciones extremas que pueden generar muerte celular, los diluyentes deben ser citoprotectores, aportar energía, proteger de agentes microbianos perjudiciales, mantener un pH óptimo, y a su vez los crioprotectores con diferentes pesos moleculares deben proporcionar los medios osmóticos adecuados para la deshidratación correcta de las células seminales y así evitar la formación de cristales de hielo intracelulares que las puedan dañar (Duque, Restrepo y Rojano 2016) y (Acosta et al., 2006).

La composición de cada diluyente es un aspecto a tener en cuenta al momento de realizar procesos de criopreservación ya que no todos los diluyentes generan los mismos resultados, por tal motivo se debe realizar la elección de mezclas que garanticen a los espermatozoides una mayor sobrevivencia, como los diluyentes que presentan menores cantidades de glicerol ya que es una sustancia tóxica que puede generar daños a las células en lugar del efecto esperado de crioconservación (Bollweinb, Handler, Neuhauser y Siudab, 2019).

#### **7.4 Criopreservación y descongelación**

La congelación es uno de las etapas cruciales en la preservación espermática, dado que si no se emplean las curvas de congelación adecuadas, las células van a morir incluso si se usaron los diluyentes y crioprotectores adecuados, la forma manual tiende a predisponer a mayores errores asociados a los operarios, generando tasas de viabilidad menores comparado con el uso de sistemas automatizados que van reduciendo la temperatura de manera más precisa en los tiempos adecuados, generando un ratio de viabilidad un tanto mayor, a pesar de la existencia de estos sistemas modernos la viabilidad no supera por lo general el 50%, siendo un desafío lograr porcentajes más altos para así poder aumentar la fertilidad que se produce con el uso del semen congelado que es una herramienta que entre todos los posibles inconvenientes que presenta, es muy útil (Checa, 2018).

### **8. Conclusiones**

- La selección de semen equino para criopreservación se debe realizar haciendo la inclusión de machos sanos y reproductivamente aptos, descartando variables que no aporten a la calidad seminal.
- El uso de crioprotectores y diluyentes adecuados pueden generar mayor viabilidad post descongelación, aunque su uso no es garantía de supervivencia, siendo que el uso de

estas sustancias debe ir acompañado de semen de buena calidad y una correcta criopreservación, el estudio y comparación de estas sustancias es importante para en un futuro aumentar los porcentajes de células aptas para fertilización.

- Los equipos automatizados generan mayores tasas de viabilidad que los procesos realizados manualmente, por tal motivo es recomendable el uso de estas tecnologías acompañado de la buena selección seminal y la citoprotección para generar semen de buena calidad post-descongelación.
- Cada paso que se realiza en todo el proceso de criopreservación juega un papel importante, ya que de ser pasado por alto, la viabilidad de las muestras no será la esperada.

## **9. Referencias**

- Acosta, L., Avila, L., Delgado, L., Gómez, C., León, C., Lozano, C., Madero, J., y Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 57 No. 4 • 2006 • (291-300)
- Acosta, M., Camacho, C., Domingo, D., Pérez, J., y Restrepo, G. (2017). Congelación de Semen Equino Bajo Dos Esquemas de Adición de Dimetilformamida. Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n4/a17v28n4.pdf>

- Alarcón, V., Bravo, W., y García, W. (2012). Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v23n1/a07v23n1.pdf>
- Álvarez, S., Lozano, B., y Gil, H. (2011). Efecto de la adición de plasma seminal en el semen equino descongelado. Recuperado de: <https://scielo.isciii.es/pdf/sm/v67n3/articulo2.pdf>
- Ampuero, A., Arriaga, I., Huanca, W., y Terreros, M. (2015). Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v26n3/a08v26n3.pdf>
- Aznarán, R. (2019). Relación entre el volumen testicular, volumen del eyaculado y concentración espermática. en caballos inscritos en la asociación de criadores y propietarios del caballo peruano de paso-lambayeque. Recuperado de: <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/4597/BC-TES-3505%20AZNARAN%20VIGO.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Barrios, M., Huanca, L., Revuelta, L., y Rodríguez, G. (2016). Niveles de glucosa y triglicéridos en plasma seminal y motilidad espermática en cobayos alimentados con 10% más de energía digestible. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10(1), 75-82. [https://doi.org/10.5209/rev\\_RCCV.2016.v10.n1.52501](https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2016.v10.n1.52501)
- Benjumeda, R., y Gómez, C. (2017). La fertilidad: análisis del semen. Recuperado de: <https://www.ecuestre.es/app/caballo/temas-de-cria/la-fertilidad-analisis-del-semen>
- Boeta, M., Díaz, M., y Hayen, S. (2013). Manual de la práctica de profundización en reproducción equina. Recuperado de: [https://fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales\\_2013/Manual%20de%20Practicas%20de%20Profundizacion%20en%20Reproduccion%20Animal%20Equinos.pdf](https://fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/Manual%20de%20Practicas%20de%20Profundizacion%20en%20Reproduccion%20Animal%20Equinos.pdf)
- Bollweinb, H., Handler, J., Neuhauser, S., y Siubad, M. (2019). Comparación de los efectos de cinco diluyentes de semen en la calidad del esperma epididimario equino congelado-descongelado. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080619300887>
- Buzón, A. (2013). (Cuevas) Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer. Recuperado de: <https://core.ac.uk/download/pdf/60896121.pdf>
- Caldevill, M., Ferrante, A., y Neild, D. (2020). Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino. Recuperado de:

[http://repositorioubi.sisbi.uba.ar/gsd/collect/pveterinaria/invet/index/assoc/HWA\\_3712.dir/3712.PDF](http://repositorioubi.sisbi.uba.ar/gsd/collect/pveterinaria/invet/index/assoc/HWA_3712.dir/3712.PDF)

- Cantero, J., Montoya, J., y Restrepo, G. (2016). Efecto de la centrifugación sobre la integridad y la funcionalidad de espermatozoides equinos. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v14n1/v14n1a15.pdf>
- Cardona, J., Gonzalez, A., Ospitia, P., Otero, R., Paredes, A., y Perez, J. (2018). Efecto del medio extensor y de las curvas de enfriamiento y congelamiento en la célula espermática en caballos criollos colombianos Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/recia/v10n1/2027-4297-recia-10-01-00061.pdf>
- Castro, J., y Chacón, J. (2016). Aspectos generales del proceso de conservación de semen equino: una revisión desde la congelación espermática. Conexión Agropecuaria JDC, 6(1), 45–64. Recuperado de: <https://revista.jdc.edu.co/index.php/conexagro/article/view/54>
- Castro, K., y Gonzalez, S. (2019). Métodos modernos de evaluación seminal en equinos. Recuperado de: [http://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/12318/1/2019\\_metodos\\_modernos\\_evaluacion.pdf](http://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/12318/1/2019_metodos_modernos_evaluacion.pdf)
- Cazales, N., Costa, R. y Estrade, M., y (2020). Inseminación artificial con semen congelado equino: reacción inflamatoria, transporte espermático y técnica de inseminación. Recuperado de: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/vet/v56n214/1688-4809-vet-56-214-e401.pdf>
- Celis, A., Henao, A., Montoya, J., Restrepo, G., y Usuga, A. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rlsi/v11n2/v11n2a08.pdf>
- Checa, A. (2020). Método: Conversión de las fuerzas g (RCF) a revoluciones por minuto (rpm) y Equilibrio del rotor. Recuperado de: <https://conogasi.org/articulos/metodo-conversion-de-las-fuerzas-g-rcf-a-revoluciones-por-minuto-rpm-y-equilibrio-del-rotor/>
- Duque, J., Restrepo, G., y Rodriguez, L. (2016). Proliferación microbiana y calidad post descongelación de semen equino criopreservado en presencia de antibióticos. Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v27n2/a14v27n2.pdf>
- Duque, J., Restrepo, G., y Rojano, B. (2016). Criotolerancia de semen equino congelado con aditivos en el diluyente <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n1/a13v28n1.pdf>

- Dutra, C., Graglia, F., y Martínez, M. (2013). Diluyentes de semen equino para su uso fresco y refrigerado por 24 y 48 horas. comparación entre leche descremada uht y un diluyente comercial. Recuperado de:  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/2739/1/FV-29865.pdf>
- Elgueta, C. (2018). Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos. Recuperado de:  
<https://repositorio.udla.cl/xmlui/bitstream/handle/udla/282/a41740.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Estévez, A., García, A., y Gispert, M. (2018). Inseminación artificial en caballos. Recuperado de:  
[https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2009/80139/inseminacion\\_artificial\\_en\\_caballos.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2009/80139/inseminacion_artificial_en_caballos.pdf)
- González, J., Herrera, J., Rodríguez, A., y Vargas, A. (2015). Recolección y manipulación seminal. Recuperado de:  
[https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recolleccion\\_manipulacion.pdf](https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recolleccion_manipulacion.pdf)
- González, M., Llanos, J., Oropeza, A., Rodríguez, C., y Wong, Y. (2014). Uso de Plasma Seminal en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Equinos. Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v26n2/a22v26n2.pdf>
- Gutiérrez, L. (2014). Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal. Recuperado de:  
<https://eprints.ucm.es/id/eprint/24898/1/T35236.pdf>
- Imposti, C. (2018). Inseminación artificial con semen congelado en profundidad con la utilización de una pajuela en yeguas. Recuperado de:  
<https://ridaa.unicen.edu.ar:8443/server/api/core/bitstreams/72b83b5e-2efa-4ace-a3a9-36139d4ad2d8/content>
- Landivar, S., Pesántes, J., Ramónéz, J., y Rodríguez, D. (2017). Efecto de agentes crioprotectores no permeables y uno comercial sobre las características físicas de semen bovino postdescongelación. Recuperado de:  
<file:///C:/Users/ERangel/Downloads/Dialnet-EfectoDeAgentesCrioprotectoresNoPermeablesYUnoCome-8383546.pdf>
- López, E. (2021). Utilidad del dimetilsulfóxido para la criopreservación de muestras de líquido sinovial. Recuperado de:  
[https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/54720/TFG\\_Lopez\\_Bardon\\_Elsa.pdf?sequence=3](https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/54720/TFG_Lopez_Bardon_Elsa.pdf?sequence=3)

- Montoya, J. (2016). Congelación de semen de asnos criollos colombianos empleando diferentes alternativas de suplementación en los diluyentes. Recuperado de: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/56801/1020417714.2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Paredes, A. (2015). Determinación de la viabilidad espermática post descongelamiento, bajo efecto de la adición fraccionada de dimetilformamida en caballo criollo colombiano. Recuperado de: [https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1272&context=medicina\\_veterinaria](https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1272&context=medicina_veterinaria)
- Pineda, S., y Pinilla, S. (2007). Comparación de dos diluyentes Lactosa-glicerol-yema de huevo; inra-dformamida-yema de huevo en la preservación de semen equino. Recuperado de: [https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1314&context=medicina\\_veterinaria](https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1314&context=medicina_veterinaria)
- Ramón, J., Landívar, S., Pesántez, J., & Rodríguez, D. (2017). Effect of nonpermeable cryoprotectants and commercial one on the physical characteristics of postfreeze bovine semen [Ebook]. Ecuador
- Restrepo, G., Ocampo, D., y Velásquez, A. (2013). Evaluación de la movilidad del semen criopreservado de caballos criollo colombiano por un sistema analizador de clase. Recuperado de: <https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/1768/Art%c3%adculo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Restrepo, G., Rojano, B., Úsuga, A. (2013). Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428109006.pdf>
- Rodríguez, I. (2010). Inseminación artificial o monta dirigida en la yegua. Recuperado de: [https://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_equinos/produccion\\_equina\\_en\\_general/70-Inseminacion\\_artificial.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_equinos/produccion_equina_en_general/70-Inseminacion_artificial.pdf)
- Rvet. (2018). Colecta de semen en las distintas especies. Recuperado de: <https://www.reproduccionveterinaria.com/tecnologias-y-biotecnologias-de-la-reproduccion/colecta-y-criopreservacion-de-semen/colecta-de-semen/>

- Saltos. (2009). Efectos de la centrifugación en la motilidad espermática del semen equino refrigerado. Recuperado de:  
<https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/578/1/82902.pdf>
- Sandoval, C. (2010). Efecto sobre motilidad espermática de distintas leches descremadas comerciales utilizadas como diluyente de refrigeración de semen equino. Recuperado de: <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131373/Efecto-sobre-motilidad-espermatologica-de-distintas-leches-descremadas-comerciales-utilizadas-como-diluyente-de-refrigeracion-de-semen-equino.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Serres, C. (2012). Métodos tradicionales y alternativos de extracción de semen. Recuperado de:  
[https://www.researchgate.net/publication/272492707\\_METODOS\\_TRADICIONALES\\_Y\\_ALTERNATIVOS\\_DE\\_EXTRACCION\\_DE\\_SEMEN](https://www.researchgate.net/publication/272492707_METODOS_TRADICIONALES_Y_ALTERNATIVOS_DE_EXTRACCION_DE_SEMEN)
- Valbuena, J. (2021). Descripción de los Parámetros Seminales y Análisis del Crecimiento Bacteriano con el Método Reproductivo Artificial Eyaculado del Equino. Recuperado de:  
<http://repositorio.uan.edu.co/bitstream/123456789/5891/3/2021.TG.Valbuena%2CJessica.pdf>
- Wernli, J. (2010). Actualidad sobre la congelación de semen equino y análisis de nuevas propuestas en la composición de los diluyentes. Reporte de caso. Artritis séptica en potros. Recuperado de:  
[https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1240&context=medicina\\_veterinaria#:~:text=Seg%C3%BAAn%20Weiss%20et%20al.,buena%20calidad%20de%20congelaci%C3%B3n%20seminal](https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1240&context=medicina_veterinaria#:~:text=Seg%C3%BAAn%20Weiss%20et%20al.,buena%20calidad%20de%20congelaci%C3%B3n%20seminal)