

**Diluyentes utilizados para mejorar la congelación del semen en equinos:
revisión de literatura**

Lina Alexandra Uriza Rodríguez – 12708

Nicolas Velasco Alarcón - 18719

Fundación universitaria Agraria de Colombia

Facultad de ciencias agrarias

Programa de medicina veterinaria

Director: Dr. Rodrigo Forero Carrillo

Bogotá, Colombia

Marzo 2024

Resumen

Los diluyentes se han establecido como una alternativa para compensar los daños que se presentan durante el proceso de criopreservación en el semen equino, esto debido a que los espermatozoides de los sementales tienen una baja resistencia al proceso de enfriamiento, congelación y posterior descongelación. La toxicidad del plasma seminal, el estrés osmótico, la criocapacitación, las modificaciones estructurales en la membrana espermática, la apoptosis, entre otras, son algunos de los daños reportados en la evaluación del semen equino post-descongelación. La composición de estos diluyentes suele contener medios base que aportan sustrato energético, compuestos tampones (buffers), antibióticos y agentes crioprotectores, sin embargo, es motivo de investigación la optimización de los diluyentes lo cual busca garantizar la máxima viabilidad y fertilidad posible del semen congelado. Esto es fundamental ya que el uso de semen congelado del semental equino minimiza la propagación de enfermedades, elimina barreras geográficas y preserva el material genético del animal por tiempo ilimitado.

Palabras clave: *Diluyentes, criopreservación, semen equino, estrés osmótico, apoptosis.*

Abstract

Diluents have been established as an alternative to compensate for the damage that occurs during the cryopreservation process in equine semen, due to the fact that the sperm of stallions have a low resistance to the cooling, freezing and subsequent thawing process. Seminal plasma toxicity, osmotic stress, cryocapacitation, structural modifications in the sperm membrane, apoptosis, among others, are some of the damages reported in the evaluation of post-thawing equine semen. The composition of these diluents usually contains base media that provide an energy substrate, buffer compounds, antibiotics and cryoprotective agents. However, the optimization of the diluents is a matter of research, which seeks to guarantee the maximum possible viability and fertility of the frozen semen. This is essential since the use of frozen semen from the equine stallion minimizes the spread of diseases, eliminates geographical barriers and preserves the animal's genetic material for an unlimited time.

Keywords: *Diluents, cryopreservation, equine semen, osmotic stress, apoptosis.*

Diluyentes utilizados para mejorar la congelación del semen en equinos

Los equinos hoy en día son de gran importancia debido a las diferentes actividades que pueden desarrollar, ya sea de entretenimiento, deportivas, trabajo, transporte, entre otras. El valor de los equinos está determinado por su aptitud para el uso que se les desea dar, dependiendo de la raza, del grado de adiestramiento, del potencial de rendimiento y de otros factores. Surge entonces la necesidad de desarrollar estrategias apropiadas de reproducción para lo cual la implementación de biotecnologías reproductivas como la criopreservación y la inseminación artificial se convierten en un recurso técnico de alto valor (Acosta, 2021).

En los últimos años se han introducido en la industria equina mejoras a la criopreservación de espermatozoides, las cuales han facilitado el comercio nacional e internacional del semen equino. Es importante nombrar que, debido a la existencia de diferencias individuales, solo pocos equinos responden favorablemente a este proceso. Como lo mencionan (Castro y Chacón, 2016), el 20% de los sementales responden bien a la congelación, el 60% lo hacen de una manera aceptable y un 20% son deficientes; y los porcentajes de preñez varían entre 19 y 84%. Las posibles causas contribuyentes a estas diferencias en el éxito de congelación incluyen: el tipo de diluyente utilizado; la carga microbiológica en el eyaculado y factores genéticos.

El proceso de criopreservación, adicionalmente, ayuda al control de la diseminación de enfermedades venéreas y, permite a su vez, la inseminación de varias yeguas con un solo eyaculado. No obstante, la calidad del semen descongelado es inferior respecto al semen fresco o refrigerado, lo cual queda demostrado por la disminución de la tasa de preñez. Esto sucede por los cambios que sufre la célula espermática durante el proceso de congelación, que conllevan a la pérdida de la integridad y de la función de la membrana plasmática, atribuido al choque térmico, al estrés osmótico y oxidativo, a la formación de cristales y a la apoptosis (Pérez., *et al* 2017).

Teniendo en cuenta lo anterior, la composición de los diluyentes para la criopreservación del semen equino es determinante debido a que, además de que aporta nutrición y un medio estable para el espermatozoide, se busca proteger y compensar los daños que se presentan durante

el proceso, usando compuestos que tienen propiedades osmóticas, antioxidantes y crioprotectoras para preservar la membrana celular, las estructuras y moléculas intracelulares, esto con el fin de mejorar los procesos de transporte y almacenamiento del semen (Duque *et al.*, 2017; Castro y Chacón, 2016).

Objetivos

1. Objetivo general:

- Describir la composición de los diluyentes utilizados para mejorar la congelación del semen en equinos

2. Objetivos específicos:

- Identificar los principales componentes de los medios de congelación y su función
- Describir los componentes y niveles convenientes para el uso en los diluyentes de congelación en el semen de equinos
- Identificar los factores de protección de los componentes de los diluyentes en la congelación del semen equino

Marco de referencia

Procesamiento del semen para la inseminación

Cuando se utiliza semen fresco se obtiene el semen mediante cualquier dispositivo de recolección, en general vagina artificial, posteriormente se utiliza en la yegua mediante inseminación. Para el caso del semen refrigerado, se obtiene el semen mediante la vagina artificial, se refrigera a 17°C, el semen se filtra para retirar la porción gelatinosa, se procede a centrifugar y aplicar el diluyente que se desea o la marca que se utilice y se empaca para poder transportar y utilizar hasta por 8 horas (Contexto Ganadero, 2023), la temperatura se va disminuyendo de forma gradual hasta 0,5° cada minuto hasta llegar a 5°C (Malagón *et al.*, 2013). En semen fresco y refrigerado también se pueden utilizar diluyentes para evitar la contaminación y proveer nutrición y protección a las células espermáticas, manteniendo temperaturas de 4 a 6 °C por 48 horas (del Campo, 2023).

Semen refrigerado

Esta técnica consiste en refrigerar el semen a 4 o 5 °C por 24 a 48 horas en buenas condiciones de higiene y posteriormente utilizarlo para inseminar las hembras, aunque existen reportes que datan de hasta 80 horas utilizando diluyentes específicos. Esta técnica requiere una muy buena logística para sincronizar las hembras, el transporte del semen y los tiempos de inseminación, respetando estos aspectos el producto puede tener tasas de preñez similares a la monta natural (Chamba-Ochoa *et al.*, 2017).

La fertilidad del semen refrigerado y almacenado ha sido evaluada en yeguas inseminadas y los datos son muy variables según cada semental, las técnicas de refrigeración, la temperatura de almacenamiento, si tiene algún diluyente, el número de células espermáticas, el número de inseminaciones y otros. La reducción de la temperatura es notable a partir de las 24 horas, pero se logra preñez en más del 65% de las inseminaciones, cuando se refrigera a 4°C por 48 horas (Dellepiane *et al.*, 2015).

Semen congelado

Después de la evaluación microscópica para evaluar la motilidad (debe ser mayor al 50%), se comienza a bajar la temperatura de forma gradual. Generalmente se requiere una concentración de 100 millones por ml (pajillas de 0,25 ml), lo que se consigue normalmente con la centrifugación, para lo que se usan 400 a 600 gravedades (g) durante 10 minutos, en una dilución de 1 en 1 obteniéndose un precipitado que se diluye de nuevo hasta lograr mantener la concentración de espermatozoides deseada con un diluyente con crioprotectores permitiendo un tiempo de contacto conocido como equilibrio, que varía con el crioprotector usado. Después del empaque del semen diluido y de lograr la temperatura buscada, se procede a la congelación (Castro y Chacón, 2016, Gutiérrez, 2014). Usualmente, se realiza el empaque en pajillas, y la congelación, se hace en un recipiente con nitrógeno líquido, a una altura establecida sobre el nivel de este líquido o con congeladores automáticos programables, los protocolos de congelación varían las condiciones como, tiempos o temperaturas, según los distintos tipos de diluyentes y crioprotectores y luego las pajillas se sumergen totalmente en nitrógeno de manera que quedan almacenadas hasta el uso. (Gutiérrez, 2014, Pérez *et al*, 2017).

Restrepo *et al.*, 2013 y Lozano *et al.*, 2011 mencionan que al descongelarse debe estar por encima del 70%, motilidad progresiva mayor al 60% y una concentración de por lo menos 100 millones de células espermáticas/ml. Solo pocos equinos responden favorablemente al proceso de congelación. El 20 % de los sementales responden bien a la congelación, el 60 % lo hacen de una manera aceptable y un 20 % son deficientes y los porcentajes de preñez varían entre 19% y 84 %. Las posibles causas contribuyentes a estas diferencias en el éxito de congelación incluyen: el tipo de crioprotector utilizado; la carga microbiológica en el eyaculado; dosis administrada y factores genéticos (Castro y Chacón, 2016).

Efectos de la congelación en el semen

Desde la obtención, existen diferentes fuentes de daño al espermatozoide que lo afectan durante todo el proceso. Por ejemplo, al centrifugar, se pierde al menos 10% de las células por choque mecánico entre ellas, lo que puede afectar la motilidad y la membrana acrosómica. Al

modificar la temperatura los espermatozoides son sometidos a estrés y en este período de descenso de temperatura puede haber desprendimiento de fosfolípidos de la membrana, aumento de la permeabilidad y la muerte celular; incluso se pueden formar cristales de hielo, desnaturalización de proteínas, daño osmótico y estrés oxidativo y disminución en el metabolismo de las células espermáticas. En general los dos efectos principales que causan daño en el proceso de congelación son el estrés osmótico y los cambios en la membrana celular, estos dos principales cambios afectan el citoplasma, el citoesqueleto y la composición génica de la célula (Castro y Chacón, 2016).

Sharafi *et al.*, en 2022 reportan que es en la membrana de la célula espermática el principal sitio donde hay efectos tras la congelación. Estos efectos se dividen en dos: efectos al añadir los crioprotectores y efectos al congelar el semen. En el primer caso existen efectos en cuanto al volumen celular (contracción, encogimiento), las células espermáticas son especialmente sensibles a estos cambios, donde osmóticamente puede haber pérdida de la integridad de la membrana, pérdida de la motilidad y la integridad del acrosoma.

Posterior al equilibrio entre los agentes crioprotectores y las células espermáticas, el enfriamiento o disminución de la temperatura causan efectos adversos en las células. Los cambios en la osmolaridad inducidos por la congelación y descongelación son dramáticos para las células espermáticas, causando altos niveles de estrés, sin embargo, algunos agentes crioprotectores protegen en este sentido. En general, el mayor porcentaje de daño ocurre en la membrana plasmática, por lo que los estudios van dirigidos a proteger esta membrana mediante la combinación la asociación de agentes diluyentes y crioprotectores, por ejemplo, el glicerol, los fosfolípidos y el colesterol, los cuales parecen mejorar la resistencia a los efectos en la congelación (Sharafi *et al.*, 2022).

A las tasas de congelación que se usan normalmente en el procedimiento no es fácil que se presente congelación intracelular, por lo que la principal fuente de daño del espermatozoide equino parece ser el efecto solución durante la congelación y la descongelación, en el que la célula se expone a condiciones hiperosmóticas e hiposmóticas respectivamente, con la consecuente crenación y aumento de volumen correspondientes (Peña *et al.*, 2011). Con la

exposición a soluciones hipertónicas, es posible que la célula recupere su tamaño después de ser expuesta a unos 900 mOsm/kg, pero el prososo supera los 1500 mOsm/kg, sin embargo, por encima de solo 400mos/kg los espermatozoides pueden no recuperar la motilidad inicial cuando la osmolaridad se normaliza. La hiperosmolaridad actúa sobre diferentes compartimentos celulares, la membrana, el citoesqueleto y las mitocondrias, por ejemplo (Peña *et al.*, 2011).

La congelación y el procesamiento del semen de los caballos produce un incremento en la generación de radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ERO) debido al desacoplamiento del metabolismo oxidativo normal de los espermatozoides lo cual hace que se pierda la actividad de defensa antioxidante, la presencia de células en proceso de muerte o apoptosis. Esta situación de estrés produce la oxidación de los ácidos grasos, de las proteínas e incluso del ADN de los espermatozoides, lo que genera una reducción de la movilidad, la vitalidad y la capacidad de fertilización (Restrepo *et al.*, 2019). Por otro lado, cuando células espermáticas son sometidas a criopreservación, la separación de los espermatozoides del plasma seminal durante el procesamiento del semen para la congelación, junto con el enfriamiento de que son objeto las células durante el proceso, causan un fenómeno similar a la capacitación fisiológica, al cual se le ha denominado “criocapitación” (Acosta,2021).

El semen de los equinos exhibe un alto grado de variabilidad con respecto a la viabilidad celular posterior a la congelación. Características tales como la motilidad, porcentajes de viabilidad y características de movimiento pueden ser indicadores para clasificar adecuadamente al semen posterior a la descongelación (Prien y Iacovides, 2016).

Diluyentes y agentes crioprotectores

En general los diluyentes utilizados para congelar el semen están compuestos por sustancias que estabilizan el pH, neutralizan los productos tóxicos producidos por el metabolismo de los espermatozoides, protegen contra el choque térmico, mantienen el equilibrio electrolítico y osmótico, inhiben el crecimiento bacteriano y suministran energía. Los diluyentes también deben contener crioprotectores para evitar la formación de hielo intracelular y extracelular (Alvarenga *et al.*, 2016).

Tabla 1*Composición de los diluyentes*

Tipos de compuestos	Sustancias
Medios a base de proteína	<ul style="list-style-type: none"> - Yema de huevo - Lecitina de soja - Leche
Soluciones Buffer o tampón	<ul style="list-style-type: none"> - Citrato sódico - Citrato potásico - TRIS, HEPES, TES, o BES - Glucosa-EDTA
Antioxidantes	<ul style="list-style-type: none"> - Quercetina - L-ergotioneína - Vitamina E - Coenzima Q-10 (CoQ-10) - N-acetilcisteína - Melatonina - Fosfatos - Carbonatos
Antibióticos	<ul style="list-style-type: none"> - Penicilina G - Estreptomicina - Polimixina B - Gentamicina
Agentes crioprotectores	<ul style="list-style-type: none"> - Penetrantes - No penetrantes

Tradicionalmente los diluyentes suelen contener yema de huevo, esta se agrega en diferentes concentraciones a los diluyentes de congelación como fuente de lipoproteínas y fosfolípidos para brindar protección contra el shock por frío (Rangel, 2023, Peña *et al.*, 2011). Sin embargo, al ser un compuesto de origen animal, representa un potencial riesgo de contaminación, lo cual puede ser fuente de transmisión de enfermedades (Caldevilla *et al.*, 2020). Por ende, se ha evaluado la eficacia de la lecitina de soya como posible reemplazo al uso de la yema de huevo; esta contiene una fracción de fosfolípidos que podría sustituir a las lipoproteínas de alto peso molecular y los fosfolípidos de la yema de huevo y prevenir el daño de la membrana plasmática del espermatozoide que se produce durante el enfriamiento y la crioconservación (Caldevilla *et al.*, 2020).

Así mismo, el diluyente a base de leche desnatada representa una forma eficaz y práctica de conservación a corto plazo del semen de semental. La leche, al ser un producto biológico de composición compleja, está compuesta por sustancias beneficiosas para los espermatozoides, así como por componentes que pueden perjudicar su longevidad. Las fracciones lácteas como la α -lactoglobulina afectan negativamente la motilidad de los espermatozoides; por el contrario, la β -lactoglobulina y el fosfocaseinato nativo son beneficiosos para los espermatozoides. Por este motivo se han creado diluyentes con composiciones químicamente definidas (Sharafi *et al.*, 2022).

Para mantener la integridad del espermatozoide durante los procesos de refrigeración y/o congelación, estos diluyentes contienen soluciones amortiguadoras o también llamadas buffer, entre ellas se encuentran el citrato sódico, citrato potásico y reactivos sintéticos como TRIS, HEPES, TES, BES; estos ayudan a mantener el pH en límites adecuados para la supervivencia de las células. Los azúcares mejoran la motilidad del esperma durante el almacenamiento, se usan monosacáridos como glucosa, fructosa y sorbitol, los cuales son los más frecuentemente utilizados en los diluyentes y se encuentran presentes de forma natural en el plasma seminal; también se emplean disacáridos como lactosa, rafinosa, sacarosa y trehalosa (Rangel, 2023). Además, se agregan antibióticos como penicilina G, estreptomina, polimixina B y antioxidantes como la N-acetilcisteína o coenzima Q-10 (Treulen *et al.*, 2019; Castro y Chacón, 2016); esto debido a que cuando se diluye el semen con el fin de obtener más dosis de una sola eyaculación y

hacer crioconservación se disminuyen las concentraciones de componentes naturales de los antioxidantes. La reducción de los antioxidantes debido a la dilución junto con un aumento en la producción de radicales libres durante la crioconservación exacerba la condición de los espermatozoides y se degrada aún más su calidad posdescongelación y su capacidad fertilizante. Por este motivo una de las estrategias utilizadas durante la criopreservación seminal de muchas especies de animales es agregar antioxidantes a los diluyentes de criopreservación (Acosta,2021).

Un grupo de componentes frecuentemente evaluados corresponde a los crioprotectores los cuales son sustancias hidrosolubles y de baja citotoxicidad que ayudan al espermatozoide a resistir la reducción de temperatura durante el proceso de criopreservación; al disminuir el punto eutéctico (temperatura más baja), la deshidratación celular se dará a una temperatura menor y el estrés osmótico será menor (Ochoa y Álvarez, 2022). Como se evidencia en la [Tabla 2](#), se conoce gran variedad de agentes crioprotectores que ejercen su función a nivel intracelular (penetrantes) o extracelular (no penetrantes).

Tabla 2*Clasificación de sustancias con acción crioprotectora*

Crioprotectores penetrantes	
- Glicerol	Son compuestos de bajo peso molecular (92.09 g/mol) y permeables a través de la membrana plasmática que producen una reorganización de los compuestos lipídicos y proteicos de esta que hace incrementar su fluidez, favoreciendo la deshidratación celular a bajas temperaturas y disminuyendo la formación de cristales de hielo intracelulares, lo que incrementa la supervivencia espermática a la congelación actuando tanto en el medio intracelular como extracelular ^a .
- Dimetilsulfóxido (DMSO)	
- Metilformamida (MF)	
- Dimetilformamida (DMF)	
- Propilenglicol	
Crioprotectores no penetrantes	
Azúcares:	Son compuestos de elevado peso molecular (180.00 g/mol) ^a . Actúan aumentando la presión osmótica del líquido extracelular y por lo tanto extraen agua del espermatozoide, lo que disminuye el riesgo de formación de cristales de hielo y así el daño físico. Sin embargo, no disminuyen la deshidratación y el aumento de la concentración de solutos ^b .
- Glucosa	
- Fructosa	
Disacaridos:	
- Lactosa	
- Rafinosa	
- Trehalosa	
- Lipoproteínas de yema de huevo	
- Lecitina de soya	

Nota. ^a Ochoa y Álvarez, (2022). ^b Contreras *et al.*, (2023).

Entre los crioprotectores penetrantes, el glicerol es posiblemente el más utilizado para la congelación de semen equino; sin embargo, el uso de la dimetilformamida (DMF) ha proporcionado un aumento posdescongelación de la movilidad y de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, en comparación con el uso de glicerol. Se conoce que la DMF, como parte del diluyente, reduce de forma significativa los efectos negativos de la congelación. Esto se atribuye a su menor peso molecular respecto a crioprotectores como el glicerol y, por lo tanto, a su mayor potencial para atravesar la membrana plasmática; resultando en un equilibrio más rápido entre las regiones intra y extracelular y, teóricamente, en un menor potencial para generar daño espermático mediante el choque osmótico (Pérez *et al.*, 2017)

Existen diversos agentes diluyentes formulados que se destacan por su utilización en la criopreservación del semen equino con múltiples ensayos para determinar su efectividad, por ejemplo, las soluciones de leche descremada y azúcar denominados INRA-82® e INRA-96® (sales de Hanks, glucosa, lactosa, rafinosa, fosfocaseína, citrato sódico, citrato potásico y leche desnatada) este diluyente primario protege el esperma y mantiene su viabilidad durante el proceso de centrifugación (Acosta,2021), con suplementos tales como yema de huevo y glicerol. Otro desarrollo realizado es el denominado diluyente de Cáceres (solución de Hank suplementada con HEPES, glucosa, lactosa, BSA y fosfocaseinato de leche, yema de huevo, dimetilformamida y glicerol); otro ejemplo es un diluyente comercial compuesto por agua ultrapura, aminoácidos, carbohidratos, glicerol, amidas, gentamicina, penicilina y yema de huevo (Restrepo *et al.*, 2014).

Otras alternativas son los diluyentes compuestos por soluciones tampón, leche, yema de huevo y glicerol, otra marca comercial está constituida por caseinatos, proteínas de suero, glucosa, sacarosa y sulfato de gentamicina lo que evita la posible contaminación. La amplia gama de formulaciones existentes en los diluyentes para el uso en equinos hace que se deba verificar la efectividad y medición de los diversos parámetros al descongelar el producto y la medición de indicadores de calidad (Restrepo *et al.*, 2014).

Evaluación del semen descongelado

En el proceso de descongelación del semen también ocurren cambios que pueden afectar la calidad de ese semen congelado, por lo que se realizan pruebas de mínimo tres pajillas descongeladas y se evalúan microscópicamente, se mide motilidad post-descongelación (30-35%), mortalidad progresiva la cual debe ser alrededor del 20 al 35% y la morfología normal (alrededor del 70%), detectando anomalías en las células, también se puede medir índice de criosupervivencia (Lozano *et al.*, 2011; Castro y Chacón, 2016).

Dentro de las pruebas que se utilizan para evaluar el semen al descongelarse existen la motilidad espermática, porcentaje de membranas íntegras o intactas, motilidad total y progresiva, porcentaje de fertilidad post-descongelación (Ochoa y Álvarez, 2022). Otras pruebas que se realizan para evaluar la calidad del semen descongelado son: viabilidad (mediante tinción de eosina-nigrosina), morfología (evaluación del espermatozoide completo, flagelo, cuerpo medio, anomalías en la cabeza, gota distal, resistencia hipo-osmótica (prueba de HOS), se pueden realizar pruebas como citometría de flujo, actividad mitocondrial, nivel de oxidación, integridad del acrosoma, integridad del ADN, integridad de la membrana plasmática, los anteriores mediante técnicas más avanzadas que requieren equipos y laboratorio especializados. En resumen: se evalúan la concentración, cinética, morfología e integridad de las membranas (Battut *et al.*, 2017).

Metodología

Para el desarrollo de este trabajo se realizó una revisión sistemática de literatura con el fin de analizar y compilar datos que permitan identificar y describir los principales componentes utilizados en los diluyentes junto con su función, los tratamientos y niveles en los que fueron implementados estos componentes en cada investigación y sus factores en cuanto a la protección del semen equino durante el proceso de criopreservación. La información reunida se organizó en tablas, los resultados de dichos estudios se redactaron de una forma concisa y posteriormente se realizó conclusiones y recomendaciones.

Resultados

Tabla 3*Artículos evaluados a partir de la revisión sistemática de literatura*

Autores	Finalidad del estudio	Tipos de compuestos evaluados	Compuestos
Acosta, 2021	Evaluación del efecto de dos antioxidantes no enzimáticos adicionados al diluyente de congelación seminal EquiPlus®	Antioxidantes	<ul style="list-style-type: none"> - Quercetina - L-Ergotioneína - Inhibidor de la PKA
Caldevilla, <i>et al</i> 2020	Probar si el diluyente AndroMed® a base de lecitina de soja, es efectivo para congelar semen equino	Crioprotectores penetrantes Proteína animal - vegetal	<ul style="list-style-type: none"> - Dimetilformamida - Glicerol - AndroMed® - Lecitina de soya
Duque, <i>et al</i> 2017	Evaluar el efecto de dos aditivos sobre la capacidad antioxidante total del diluyente de congelación y la criotolerancia del semen equino	Antioxidantes Crioprotectores	<ul style="list-style-type: none"> - Quercetina - Fosfatos y carbonatos
Ferreira S., <i>et al</i> 2018	Evaluación in vitro de la motilidad y la actividad de la acrosina en espermatozoides criopreservados utilizando diferentes diluyentes	Medios a base de proteína Crioprotectores penetrantes	<ul style="list-style-type: none"> - Lactosa - Yema de huevo - Glicerol
Ferreira H., <i>et al</i> 2019	Evaluación funcional de la elección de diluyente para la criopreservación de semen de sementales con alta y baja congelabilidad	Comparación general de los 3 diluyentes sin profundizar en sus compuestos	-
Gheller, <i>et al</i> 2019	Estudio sobre la adición de goma xantana al diluyente estándar para conservar la calidad del esperma equino	Crioprotector no penetrante Antioxidante	Goma xantana

Autores	Finalidad de estudio	Tipos de compuestos evaluados	Compuestos
Lançoní, <i>et al</i> 2021	Mejorar la calidad del semen de sementales después de la congelación mediante la adición de CoQ-10 al protocolo de criopreservación.	Antioxidante	Coenzima Q-10
Ochoa y Álvarez, 2022	Evaluar el efecto crioprotector del GLY, la DMF y su combinación, DMF-GLY, sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos	Crioprotectores penetrantes	- Dimetilformamida - Glicerol
Pérez, <i>et al</i> 2017	Evaluar la calidad posdescongelación de semen equino sometido a dos esquemas de adición de dimetilformamida (DMF) durante la congelación	Crioprotectores penetrantes	- Dimetilformamida
Rečková, <i>et al</i> 2022	Análisis sobre la eficiencia de diferentes tipos de diluyentes para enfriamiento de semen en sementales	Comparación general de los 3 diluyentes sin profundizar en sus compuestos	-
Remezovski, <i>et al</i> 2019	Evaluación del efecto de Trehalosa y Duodecil Sulfato de Sodio adicionados a un diluyente base para criopreservación en equinos	Crioprotector no penetrante	Trehalosa
Restrepo, <i>et al</i> 2019	Evaluación sobre el aporte antioxidante del plasma seminal y su efecto sobre la calidad del semen equino congelado	Antioxidante	Plasma seminal

Tabla 4*Diluyentes y tratamientos implementados en cada artículo*

Autores	Diluyentes base	Tratamientos
Acosta, 2021	EquiPlus® modificado con una adición de 5% de yema de huevo y 5% de dimetilformamida	<ol style="list-style-type: none"> 1. Control 2. Quercetina 100 μM (Q) 3. L-ergotioneína (E) 150 μM 4. H89 20 μM 5. H89 20 μM + quercetina 100 μM (H89Q) 6. H89 20 μM + L-ergotioneína 150 μM (H89E).
Caldevilla, <i>et al</i> 2020	Diluyente base (50 % de lactosa al 11 %, 25 % EDTA-glucosa, 0,5 % Equex, 20% de yema de huevo)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Diluyente base con 5% de DMF 2. Diluyente base con 2,5% de DMF y 2,5% de GLY 3. Diluyente comercial para semen bovino: AndroMed® 4. Diluyente para semen bovino AndroMed® suplementado 2,5% de DMF.
Duque, <i>et al</i> 2017	Diluyente a base de caseinatos de sodio, azúcares, antioxidantes, antibióticos, 5% de N,N-dimetilformamida y 5% de yema de huevo centrifugada.	<ol style="list-style-type: none"> 1. T0: Control 2. T1: Q 100 μM 3. T2: Fosfatos y carbonatos (Na₂HPO₄ 0.32mg/ml+ KH₂PO₄ 0.67mg/ml + K₂CO₃ 0.39 mg/ml).
Ferreira S., <i>et al</i> 2018	Diluyente de semen Merck o Zorlesco	<ol style="list-style-type: none"> 1. 25 ml de diluyente Merck +50 ml de solución de lactosa al 11% +20 ml de yema de huevo +0,8 ml de Orvus-Paste®; +5 ml de GLY. 2. 25 ml de diluyente Zorlesco +50ml de solución de lactosa al 11% +20 ml de yema de huevo +0,8 ml de Orvus-Paste®; +5 ml de GLY.
Ferreira H., <i>et al</i> 2019	Botu-Crio® Lactosa-EDTA® INRA-82®	<ol style="list-style-type: none"> 1. Botu-Crio® 2. INRA-82® 3. Lactosa-EDTA®

Autores	Diluyente base	Tratamientos
Gheller, <i>et al</i> 2019	Diluyente estándar	<ol style="list-style-type: none"> 1. Control (solo diluyente estándar) 2. Goma xantana al 0,01% añadido al diluyente estándar 3. Goma xantana 0,12% añadido al diluyente estándar 4. Goma xantana 0,25% añadido al diluyente estándar
Lançoni, <i>et al</i> 2021	Botucurio®	<ol style="list-style-type: none"> 1. Control: Diluyente Botucurio® 2. 50 µmol de CoQ-10 añadidos al diluyente Botucurio®; 3. 1 mmol de CoQ-10 añadido al diluyente Botucurio®.
Ochoa y Álvarez, 2022	Botusemen-Gold®	<ol style="list-style-type: none"> 1. Botusemen-Gold® con DMF al 5% 2. Botusemen-Gold® con GLY al 5% 3. Botusemen-Gold® GLY-DMF al 3%-3%
Pérez, <i>et al</i> 2017	INRA82®	<ol style="list-style-type: none"> 1. INRA82® con adición inmediata de 5% de DMF 2. INRA82® con adición fraccionada de 5% de DMF
Rečková, <i>et al</i> 2022	Diluyente a base de leche desnatada INRA-96® BotuSemen Gold®	<ul style="list-style-type: none"> - Diluyente a base de leche desnatada - INRA-96® - BotuSemen Gold®
Remezovski, <i>et al</i> 2019	Diluyente base EDTA-Lactosa con 20% de yema de huevo y 5% de dimetilformamida	<ol style="list-style-type: none"> 1. T1,6 (0,156%) 2. T3,3 (0,312%) 3. T6,3 (0,624%) 4. T3,3 con SDS12 (0,125%); SDS25 (0,250%); SDS50 (0,500%).
Restrepo, <i>et al</i> 2019	Diluyente a base de leche semidescremada, caseinatos de sodio y azúcares, suplementado con 4% de yema de huevo y 5% de N,N dimetilformamida	<ol style="list-style-type: none"> 1. Control (solo diluyente base) 2. 10% (PS10) añadido al diluyente base 3. 20% (PS20) añadido al diluyente base

Nota. Q: Quercetina; E: L-ergotioneína; H89: Inhibidor de la PKA; DMF: Dimetilformamida; CoQ-10: Coenzima Q-10; GLY: Glicerol; PS: plasma seminal; SDS: Duodecil sulfato de Sodio; T: Trehalosa

En el trabajo realizado por (Acosta,2021) se evaluó el efecto de dos antioxidantes no enzimáticos, Quercetina (Q) y L-Ergotioneína (E) y un inhibidor de la PKA (H89) adicionados al diluyente de congelación seminal EquiPlus® (modificado con una adición de 5% de yema de huevo y 5% de dimetilformamida) con el fin de evaluar la integridad y funcionalidad espermática en eyaculados de 5 sementales criollos colombianos. Las muestras se suplementaron de acuerdo con los tratamientos que se describen en la Tabla 4. Los resultados evidenciaron la efectividad de los antioxidantes frente a la presencia de especies reactivas de oxígeno (EROS) y nitrógeno (ERNS) en semen equino post-descongelación. Para la evaluación de formación de EROS implementaron el uso de una sonda no fluorescente 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) la cual se difunde a través de la membrana espermática, donde es oxidada por las EROS y ERNS presentes, originando el compuesto fluorescente 2,7 diclorofluoresceína (DCF), la intensidad de fluorescencia emitida está directamente relacionada con la cantidad de EROS/ERNS de cada muestra evaluada. En el estudio reportan que la quercetina (Q) logró reducciones en el contenido de EROS/ERNS cercanas al 21% cuando se suplementó las muestras de semen criopreservado con 100 μM de esta. De igual manera, la combinación ya sea de quercetina con H89 (H89Q) o la combinación de quercetina con L-Ergotioneína (H89E) también mostraron buenos resultados como antioxidantes, incluso se muestran mucho más efectivos que el uso independiente de L-Ergotioneína o H89; ya que los resultados obtenidos con la L-Ergotioneína 150 μM inhibió un 20% el nivel de EROS en el semen equino.

Para evaluar la peroxidación lipídica en las muestras seminales implementaron un método el cual se basa en la incapacidad de la sonda C11 – BODIPY581/591 para fluorescer en solución. Los cambios de fluorescencia reflejan indirectamente la presencia de ácidos grasos oxidados en la muestra, esto debido a que la sonda posee 2 dobles enlaces conjugados que son susceptibles a la oxidación a causa de los ácidos grasos oxidados provenientes de las muestras biológicas teniendo como resultado la oxidación del dieno y un cambio en la longitud de onda de la sonda de roja a verde. Acosta, 2011 menciona que todos los tratamientos, excepto L-Ergotioneína, redujeron la peroxidación lipídica de membrana. Al parecer el H89 la disminuye hasta el 30% o más con respecto al control. Adicional a esto, percibieron un posible efecto sinérgico de H89 y Q, dado que la protección de H89Q fue mayor en comparación a la que conferida por los compuestos individuales. De igual forma se evidenció un posible efecto

sinérgico entre H89 y E ya que la reducción de la peroxidación lipídica fue mayor que sus contrapartes individuales.

La yema de huevo, empleada de rutina en numerosos protocolos de congelamiento de semen, presenta como limitantes ser un compuesto de origen animal y un potencial riesgo de contaminación. Debe ser procesada al momento de su utilización y al poseer gránulos de tamaño similar a los espermatozoides, interfiere con la evaluación del semen. El objetivo del trabajo realizado por (Caldevilla, et al 2020); fue probar si el medio AndroMed® que es un diluyente comercial que contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, buffers, glicerol, agua de altísima pureza y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina); el cual es implementado para congelar semen bovino a base de lecitina de soja, es efectivo para congelar semen equino. En su estudio recolectaron el semen de 6 padrillos con fertilidad probada y establecieron los tratamientos descritos en la [tabla 4](#). En el estudio evaluaron los parámetros cinemáticos utilizando un sistema computarizado (CASA: Computer Assisted Semen Analysis) y el AndroVision® (Minitüb, Alemania). En cada muestra se analizaron los valores cinemáticos de al menos 1000 espermatozoides totales y se determinó el porcentaje de espermatozoides móviles totales y el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva. Analizaron los siguientes parámetros cinemáticos: velocidad curvilínea (VCL: velocidad media de la trayectoria de la cabeza del espermatozoide), velocidad en línea recta (VSL: velocidad media medida en línea recta entre el primer y último punto de la trayectoria), velocidad de trayectoria media (VAP: distancia promedio que el espermatozoide ha atravesado durante el período de análisis), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, amplitud de las oscilaciones de la cabeza del espermatozoide), frecuencia de bateo espermático (BCF: frecuencia con que la cabeza atraviesa la trayectoria del espermatozoide), índice de oscilación (WOB) rectitud (STR) y linealidad (LIN).

En la evaluación encontraron que en las muestras de semen equino pos-descongelado la movilidad total y progresiva fueron significativamente mayores en los medios de congelamiento con yema de huevo respecto los dos de AndroMed®. Los parámetros cinéticos VCL, VSL, VAP, ALH, BC fueron significativamente mayores en los dos diluyentes que contenían yema de huevo con respecto al diluyente AndroMed®, Sin embargo, no se observaron diferencias significativas

($p > 0,05$) en los parámetros cinéticos de LIN, STR y WOB entre los diferentes diluyentes utilizados. El uso del diluyente AndroMed® mejoró sensiblemente la visualización de los espermatozoides en el sistema computarizado que usaron para su evaluación. Así mismo, los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado fueron significativamente mayores en los medios de congelamiento con yema de huevo respecto a los dos de AndroMed®. Mientras que los porcentajes de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado fueron significativamente mayores en los medios de congelamiento AndroMed® con respecto a los de yema de huevo.

En el Valle del Aburra (Antioquia, Colombia), Duque, *et al* 2017, evaluaron el efecto de dos aditivos sobre la capacidad antioxidante total (CAT) del diluyente de congelación y la criotolerancia del semen equino en cinco caballos criollos colombianos. Para la congelación seminal se utilizó un diluyente a base de caseinatos de sodio, azúcares, antioxidantes, antibióticos, 5% de N,N-dimetilformamida y 5% de yema de huevo centrifugada. Como tratamientos consideraron la adición de suplementos: T0: Control; T1: quercetina 100 μM ; T2: fosfatos y carbonatos al diluyente base. Evaluaron por triplicado la capacidad antioxidante total (CAT) del diluyente correspondiente a cada tratamiento, mediante la prueba ABTS (solución radical ABTS, método estándar). La movilidad y la cinética espermática la evaluaron mediante el sistema SCA® (Microptic S.L., España). Se evaluó la movilidad total (MT), la movilidad progresiva (MP), la velocidad rectilínea (VSL), curvilínea (VCL) y media (VAP), los índices de linealidad (LIN), rectitud (STR) y oscilación (IO), el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), la frecuencia de batido (BCF), la hiperactividad (HIP) y los movimientos circulares (CIRC). La morfología anormal (MA) la evaluaron mediante la tinción con eosina-nigrosina, evaluándose la morfología de 200 espermatozoides en un microscopio de contraste de fase Eclipse E200.

En los resultados se evidenció que la suplementación con fosfatos y carbonatos (T2), además de producir el mayor incremento de la CAT, generó un evidente mejoramiento de la tolerancia del semen a la congelación. Por lo general, los fosfatos son utilizados por sus propiedades para regular el pH, sin embargo, entre sus propiedades antioxidantes se sabe que podrían actuar como quelantes de EROS y que tienen un muy fuerte efecto antioxidante contra la oxidación de los lípidos, por su unión a iones metálicos que actúan como catalizadores de la

oxidación, lo que les permite la reducción de la peroxidación lipídica. Esto último podría explicar la reducción de la alteración estructural y funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides, dada la presencia de fosfato de sodio y el fosfato de potasio en el T2. Las diferencias observadas que encontraron en la mayoría de los parámetros cinéticos evaluados en el semen descongelado fueron originadas por la adición de fosfatos y carbonatos. Aunque para el T2 se observó un incremento en la HIP ($p < 0.05$), los valores superiores encontrados para VSL y LIN ($p < 0.05$) son contrarios a los patrones de hiperactivación de espermatozoides equinos, quienes asociaron el movimiento hiperactivo con un descenso en VSL, STR y LIN. Otros cambios considerados como descriptivos de la hiperactividad de los espermatozoides equinos fueron la reducción de MP y BCF, así como el incremento en ALH los cuales, a excepción de la disminución en BCF ($p < 0.05$), fueron contrarios a lo observado para T2. Duque y compañía, concluyen que en su investigación no se observó ningún efecto por parte de la quercetina sobre la movilidad y la cinética espermática y que, de igual forma, no hubo diferencias por la adición de quercetina sobre la morfología e integridad de membrana. No obstante, la quercetina (T1) produjo un incremento en la CAT del diluyente respecto al T0.

Por otro lado, (Ferreira, S., *et al* 2018) realizaron un trabajo el cual tuvo como finalidad verificar la eficiencia de diferentes diluyentes para la criopreservación de semen equino utilizando la motilidad espermática y la actividad de acrosina como parámetros espermáticos, ya que como lo describen en su trabajo, a diferencia de otras pruebas que llegan a ser costosas, la medición de la actividad de acrosina no requiere equipos sofisticados y esta actividad está directamente relacionada con la integridad del acrosoma. Recolectaron el semen de dos sementales Hannoverianos de 6 a 10 años de edad e implementaron los tratamientos descritos en la [tabla 4](#). Entre los resultados obtenidos observaron que la motilidad progresiva de los espermatozoides y las alteraciones acrosómicas no difirieron entre el semen fresco y las muestras precongeladas, y que tanto el semen fresco como el precongelado mostraron mayor motilidad ($p < 0,05$) que el semen descongelado, independientemente de la elección del diluyente. Además, no se encontró correlación entre dichas alteraciones y la actividad de acrosina entre el semen y el semen descongelado con diluyentes de Lactosa-Merck y Lactosa-Zorlesco.

El objetivo del estudio realizado por (Ferreira H., *et al* 2019) fue evaluar el efecto de los diluyentes Botu-Crio®, Lactosa-EDTA e INRA-82® en semen criopreservado de sementales con alta (HFA) y baja congelabilidad (LFA). Evaluaron la motilidad de los espermatozoides en el semen congelado-descongelado en un ensayo de análisis de espermatozoides por computadora (CASA). La integridad de la membrana se llevó a cabo mediante microscopía de fluorescencia utilizando sondas de diacetato de 6-carboxifluoresceína asociadas a yoduro de propidio. La fragmentación del ADN espermático se realizó mediante un ensayo de estructura de cromatina espermática (SCSA). Como resultados observaron que el semen de los sementales HFA tuvo una motilidad espermática mayor que los sementales LFA, independientemente de la elección del diluyente, tanto inmediatamente después de la descongelación (0 h) como a la 1 h. Se obtuvieron resultados similares en 2 h, donde la motilidad del semen usando los diluyentes Botu-Crio® y Lactosa EDTA® fue mayor en el semen de sementales HFA, aunque el diluyente INRA-82® no condujo a resultados similares. En términos de elección de diluyente, la motilidad del esperma inmediatamente después de la descongelación fue mayor en Botu-Crio® que, con otros diluyentes, tanto para sementales HFA como LFA. En el mismo análisis, la motilidad de los espermatozoides en INRA-82® fue mayor que en el diluyente Lactosa-EDTA® solo para los sementales HFA. Además, la motilidad del esperma usando Botu-Crio® fue mayor que INRA-82® y Lactose-EDTA después de 2 h y 3 h en una prueba de termorresistencia (TRT) en semen de sementales tanto de HFA como de LFA. Así mismo, realizaron un análisis de la integridad de la membrana espermática. No hubo diferencias inmediatamente después de la descongelación y a las 3 h entre el semen HFA y LFA. El diluyente Lactosa-EDTA fue menos eficiente para mantener la integridad de la membrana que Botu-Crio® y similar a INRA-82®.

En el estudio diseñado por (Gheller, *et al* 2019) evaluaron los posibles beneficios de agregar goma xantana a un diluyente estándar para equinos y a través de un análisis *in vitro*, observaron la calidad del esperma. El semen se colectó cuatro veces de cinco sementales y se sometió a 3 tratamientos diferentes descritos en la [tabla 4](#). En las muestras de semen obtenidas agregaron rodamina y yoduro de propidio y se incubaron en la oscuridad para evaluar la funcionalidad, las células con fluorescencia verde intensa en la parte intermedia se consideraron funcionalmente activas, mientras que las células con fluorescencia verde menos intensa o sin fluorescencia verde en la parte intermedia se consideraron funcionalmente inactivas. Para la

integridad de la membrana agregaron al semen diacetato de carboxifluoresceína (CFDA, C4916), seguido de yoduro de propidio (PI, P4170) en formaldehído y citrato de sodio, y se incubaron durante 5 minutos en la oscuridad a 24°C. Las células que mostraban fluorescencia verde se consideraron intactas, mientras que las células con fluorescencia roja o verde se consideraron dañadas. Finalmente, para la integridad del acrosoma realizaron un frotis y añadieron yoduro de propidio (PI, P4170) los portaobjetos se secaron, los sumergieron en alcohol etílico durante 5 minutos, se lavaron en PBS, seguido de la adición de lectina. Posteriormente los portaobjetos los lavaron en agua desionizada y se escurrieron en una habitación oscura a 24°C. Las células con acrosoma intacto emitieron fluorescencia verde, mientras que aquellas con acrosoma dañado aparecieron rugosas con vacuolas y no emitieron fluorescencia verde.

Los resultados indicaron que la motilidad de los espermatozoides disminuyó en el grupo de suplementación con goma xantana al 0,25% en comparación con el grupo control; esto debido al aumento de la viscosidad en concentraciones más altas, lo que potencialmente dificulta los intercambios entre el medio interno y el entorno celular externo. Además, el aumento de la viscosidad debido a la goma xantana puede haber obstaculizado el movimiento del flagelo, impidiendo la locomoción de los espermatozoides, a pesar de que la funcionalidad mitocondrial no se vio afectada en gran medida. Otros parámetros, como la integridad de la membrana y el acrosoma indicaron que, aunque las concentraciones altas de goma xantana (0,25%) fueron perjudiciales para la integridad del acrosoma, las concentraciones más bajas (0,01% y 0,12%) mantuvieron su integridad hasta por 24 h. Cabe recordar que la goma xantana, es un biopolímero natural de alto peso molecular producido por *Xanthomonas campestris*, aumenta la viscosidad (en presencia de sales) y la estabilidad durante el almacenamiento en un amplio rango de temperaturas (4 y 93°C). Además, la goma xantana tiene el potencial de reducir el daño celular durante el proceso de enfriamiento al actuar como crioprotector externo al aumentar la viscosidad del medio extensor y al tener efectos antioxidantes (Gheller, *et al* 2019).

Otro compuesto evaluado fue la coenzima Q-10 (CoQ-10) la cual es una molécula lipídica presente en las células de mamíferos, que es capaz de promover la generación de energía a través del intercambio de electrones y protones que se produce durante la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna; además tiene un efecto antioxidante que puede

indicar una posible implicación en la infertilidad debido a que estos factores están directamente relacionados con la viabilidad de los espermatozoides, y un espermatozoide sin energía o en estrés oxidativo, probablemente no tendrá éxito en la fecundación. (Lançoni, *et al* 2021) plantearon una hipótesis sobre cómo la adición de CoQ-10 al diluyente utilizado para la criopreservación del semen puede mejorar las características de los espermatozoides posteriores a la descongelación de los sementales. Evaluaron la motilidad, la integridad plasmática y de la membrana acrosómica y el potencial de la membrana mitocondrial de los espermatozoides equinos criopreservados, centrándose en el rendimiento de la CoQ-10 en la funcionalidad mitocondrial de los espermatozoides. Para el estudio utilizaron siete sementales adultos recogieron cinco eyaculados de cada uno e implementaron 3 tratamientos descritos en la [tabla4](#). La motilidad de los espermatozoides se evaluó mediante el sistema CASA, en cuanto a la evaluación de membranas plasmáticas, acrosómicas y mitocondriales inicialmente diluyeron 150 mL de semen en el medio espermático TALP, añadieron yoduro de propidio, Hoechst, yoduro de tetracloro y aglutinina de *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína; las muestras fueron incubadas durante 8 minutos a 37°C en la oscuridad. Se contaron un total de 200 células y las clasificaron según sus patrones de tinción en porcentaje de células con membrana plasmática intacta (MIP); porcentaje de células con membrana acrosómica (IA) intacta; porcentaje de células con alto potencial de membrana mitocondrial (HMMP), y porcentaje de células completamente intactas (espermatozoides que presentan plasma intacto y membranas acrosómicas). La actividad mitocondrial la evaluaron mediante la técnica DAB, la cual se basa en la oxidación del citocromo C de la 3,3'-diaminobencidina (DAB), donde los reactivos polimerizados se depositan en los sitios de reacción, es decir, en las mitocondrias.

El tratamiento con CoQ-10, independientemente de la concentración, incrementó el porcentaje de células HMMP así como la población de espermatozoides con membrana plasmática intacta, acrosomas intactos y alto potencial de membrana mitocondrial. En general, no se observaron efectos significativos entre los tratamientos sobre la motilidad de los espermatozoides posdescongelados. En cuanto a la funcionalidad mitocondrial, se observó que el tratamiento con CoQ-10 de 1 mmol presentó mayor porcentaje de células clasificadas como DAB 1 (espermatozoides con pieza media completamente teñida), lo que indica una alta actividad mitocondrial. Además, ambos tratamientos con CoQ-10 (50 μ mol y 1 mmol) demostraron un

menor porcentaje de células DAB 3 (espermatozoides con baja actividad mitocondrial) en comparación con el grupo control. La evaluación de los espermatozoides con la sonda de fluorescencia de faloidina-FITC demostró que el tratamiento con CoQ-10 de 1 mmol preservó eficientemente el citoesqueleto celular durante el proceso de criopreservación, exhibiendo un mayor porcentaje de células sin reorganización de actina en la región post-acrosómica después de la descongelación. No se observó diferencia para el tratamiento con CoQ-10 de 50 μ mol en comparación con el grupo control (Lançoni, *et al* 2021).

En otra investigación llevada a cabo por (Ochoa y Álvarez, 2022) consistió en evaluar el efecto crioprotector del GLY, la DMF y su combinación, DMF-GLY, sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos. Para este propósito, recolectaron 24 eyaculados de cuatro caballos árabes, cada eyaculado fue diluido y luego congelado con el diluyente Botusemen-Gold® suplementado con 3 tratamientos distintos descritos en la [tabla 4](#). Las características cinéticas de las muestras de espermatozoides fresco y congelado/descongelado de cada tratamiento fueron analizadas mediante un sistema computarizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA) Las variables cinemáticas evaluadas fueron: porcentaje de motilidad total (MT), porcentaje de motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad promedio (VAP), Linealidad (LIN), Rectitud (STR), Oscilación (WOB), frecuencia de batido de flagelo (BCF), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH). Para la evaluación de las membranas prepararon una tinción de fluorescencia mezclada con una dosis de yoduro de propidio más una dosis de aglutinina; esta fue agregada sin luz a las muestras de semen. Finalmente, para la evaluación del estrés colocaron glutaraldehído al 2% disuelto en medio PBS. Las muestras las evaluaron en un microscopio de contraste de fases a 40 X de magnificación. Se contó 200 células y se determinó el porcentaje espermatozoides con colas enrolladas (colas látigo).

Los resultados que obtuvieron sugieren que los tratamientos que usan DMF (T1 y T3) producen una menor velocidad de enfriamiento en comparación con el GLY. Esto significa que el T1 produjo una respuesta de criolesión más baja a comparación de los otros tratamientos. Por el contrario, el GLY produce mayor criolesión a los espermatozoides debido a las altas velocidades de enfriamiento, lo que significa que los espermatozoides no tienen tiempo para una

deshidratación eficiente y pueden sufrir lesiones graves en el citoplasma debido a la formación de hielo intracelular letal para la célula. Igualmente, se obtuvo un menor porcentaje de motilidad y viabilidad con GLY en comparación con DMF solo o en combinación con GLY (DMF-GLY). Ochoa y compañía realizaron un análisis de factores el cual demostró que la MT (%) y MP (%) mostraron diferencias significativas: tratamientos, el tipo de semen y reproductores. Tanto la MT como la MP, fueron afectados por el proceso de criopreservación, evidenciando una reducción significativa de sus porcentajes ($P < 0,001$). Después del proceso de congelación-descongelación, los porcentajes de MT y MP de los tratamientos T3 y fueron más altos ($P < 0,01$) en comparación con el tratamiento T2. Asimismo, las velocidades curvilíneas (VCL, $\mu\text{m/s}$), rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$) y promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$) mostraron diferencias significativas ($P < 0,001$) en sus efectos principales: tratamiento, el tipo de semen y reproductores. Además, el análisis de factores evidenció una interacción significativa en la VSL. La VCL post-descongelación fue mayor ($P < 0,01$) con los tratamientos T3 ($58,0 \pm 1,71 \mu\text{m/s}$) y T1 ($54,0 \pm 1,58 \mu\text{m/s}$) comparado con el tratamiento T2 ($42,3 \pm 1,60 \mu\text{m/s}$). Sin embargo, eficientemente, la VSL y VAP de las muestras congeladas-descongeladas con el tratamiento T3 mostraron valores más altos. En cuanto al porcentaje de STR incrementó ($P < 0,001$) después de la criopreservación en todos los tratamientos sin evidenciar diferencias significativas entre tratamientos y el porcentaje de LIN, sin embargo, sólo incrementó con el tratamiento T3 después de la congelación.

Gracias a estos resultados los autores demostraron que la combinación de DMF -GLY fue más adecuada para proteger a los espermatozoides y obtener una mayor motilidad y cinemática en los espermatozoides equinos después de la descongelación.

El objetivo del trabajo realizado por (Pérez, *et al* 2017) fue evaluar la calidad posdescongelación de semen equino sometido a dos esquemas de adición de dimetilformamida (DMF) durante la congelación. Se obtuvo el semen de cinco caballos criollos colombianos, el cual fue sometido a dilución en medio INRA82® modificado con dos tratamientos de adición de DMF (tabla4). En esta investigación, la adición de DMF al semen diluido, de forma inmediata (T1) o fraccionada (T2) antes de la congelación, generó en ambos casos una reducción de la movilidad total (MT) y la movilidad progresiva (MP), que fue más severa para la adición fraccionada. A pesar de esto, no se encontró diferencia estadística para ambos parámetros entre el

semen fresco y los tratamientos con DMF en la etapa de dilución del semen. Tampoco se encontró diferencia entre tratamientos con base a la movilidad espermática posterior a la dilución. Para el semen congelado, previamente sometido en ambos tratamientos a la adición de DMF, se observó una reducción de la calidad seminal posdescongelación. La movilidad espermática presentó una reducción significativa sólo para la adición fraccionada de DMF (T2) respecto al semen fresco, mientras no se encontró diferencia entre T1 y T2, pese a la disparidad hallada entre las medias encontradas para MT y MP. Otros parámetros donde observaron cierta tendencia por efecto de los tratamientos fueron la morfología normal con una media mayor para T1, mientras que la frecuencia de batido (BCF) y la integridad de la membrana plasmática (HOS) presentaron valores mayores para T2; sin embargo, en estos casos no se halló diferencia estadística.

(Rečková, *et al* 2022) en su investigación llevaron a cabo un análisis para determinar la influencia del diluyente a base de leche desnatada (SM), el diluyente INRA-96® y el diluyente BotuSemen Gold® en los parámetros de eyaculación de los sementales. En este estudio se monitorearon 14 sementales de entre 4 y 20 años. Se evaluó la motilidad total y progresiva, la viabilidad y la morfología de los espermatozoides. La concentración, motilidad total y progresiva de los espermatozoides la determinaron con el uso del sistema Sperm Class Analyzer CASA (Microptic SL, Barcelona, España) y el microscopio Nikon Eclipse E200 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) a 37°C. La viabilidad del esperma la evaluaron mediante microscopía de fluorescencia. La muestra de eyaculación la mezclaron con el tinte Hoechst 33258 en una proporción de 1:1 y luego fue evaluada utilizando el microscopio de fluorescencia Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) con un aumento de 400x. Los frotis para la evaluación morfológica de los espermatozoides los tiñeron mediante el método Farelly y los evaluaron a través del microscopio Euromex BioBlue a 1000x utilizando aceite de inmersión. El número mínimo de espermatozoides que evaluaron fue 200. Las anomalías evaluadas fueron espermatozoides inmaduros con gotitas protoplásmicas, defectos en la cabeza, defectos en las piezas medias, defectos en la cola y defectos en el acrosoma.

Los resultados demostraron que estos factores fueron significativamente mayores en muestras de semen diluidas con diluyentes comerciales con composiciones químicamente definidas que en muestras diluidas con SM. La viabilidad del esperma fue significativamente

mayor en las muestras de semen diluidas con diluyente INRA-96®, superando a BotuSemen Gold® y SM; La viabilidad del espermatozoide de las muestras diluidas con el diluyente BotuSemen Gold® fue significativamente mayor que la viabilidad de las muestras diluidas con SM. Después de 72 horas, la proporción de espermatozoides de morfología normal fue mayor con el diluyente BotuSemen Gold que con el diluyente SM en un 8,10%. La motilidad total y progresiva del semen enfriado con INRA-96® y BotuSemen Gold® fue mayor que la del semen enfriado con el SM. En promedio, BotuSemen Gold® mantuvo valores de motilidad ligeramente más altos que INRA-96®. Sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos.

La Trehalosa (T) es un disacárido que además de ejercer actividad osmótica en el diluyente de congelamiento actúa como estabilizante de membranas gracias a su interacción con las cabezas de los fosfolípidos. El Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) es un detergente tensioactivo que disgrega las lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo, ejerciendo acción protectora sobre la célula espermática durante el shock de frío. Teniendo en cuenta lo anterior, (Remezovski, *et al* 2019) evaluaron el efecto protector de Trehalosa (T) y la combinación de T y SDS (Duodecil Sulfato de Sodio), a diferentes concentraciones (tabla 4) adicionadas a un diluyente base. Previo al procesamiento de los eyaculados evaluaron la movilidad (M) sobre platina térmica a 37°C con microscopio óptico y mediante un sistema de análisis computarizado de semen (CASA; Androvision- Minitube). Evaluaron la concentración mediante hemocitometría, utilizando una cámara de Neubauer, la funcionalidad de membranas (prueba hipoosmótica, HOS), la reacción acrosomal mediante lectinas marcadas con fluorescentes (FITC-PSA), la integridad de membrana (PV) y morfoanomalías en preparados teñidos con eosina-nigrosina. El semen descongelado fue sometido a las mismas pruebas de evaluación que el semen fresco. Observaron diferencias significativas en todos los parámetros (MTc [motilidad total CASA], PV, HOS y AI) al comparar el semen fresco con el semen congelado/descongelado, así mismo, diferencias significativas en acrosomas normales cuando se compararon los diluyentes T3,3 vs T3,3 con SDS. De igual forma, al comparar T3,3 + T3,3SDS se evidenció un descenso de todos los parámetros seminales con este último. Estos resultados demostraron el efecto deletéreo de altas concentraciones del detergente (SDS) sobre la célula espermática. Se observó un efecto protector en la integridad acrosomal de T sin SDS en comparación con T combinado con bajas

concentraciones SDS. Finalmente se evidencio que no hubo efecto sinérgico de la T y el SDS cuando se combinan en el diluyente base.

El plasma seminal (PS) posee antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos con la función de proteger los espermatozoides de los efectos nocivos del estrés oxidativo. El objetivo del estudio realizado por (Restrepo, *et al* 2019) fue evaluar el aporte antioxidante del PS durante la congelación del semen equino y su efecto sobre la calidad espermática posdescongelación. Recolectaron el semen de cinco caballos criollos colombianos, se separó el PS y se suplementó en proporciones del 0% (Control), 10% (PS10) y 20% (PS20) a la fracción espermática en el diluyente de congelación a base de leche semidescremada, caseinatos de sodio y azúcares, suplementado con 4% de yema de huevo y 5% de N,Ndimetilformamida. Evaluaron la movilidad (MOV), vitalidad (VE), morfología (MA), integridad funcional de membrana (IM) y el potencial de membrana mitocondrial (PMM) de los espermatozoides. Antes de la congelación, evaluaron la Capacidad Antioxidante Total (CAT) del semen diluido y suplementado con diferentes proporciones de PS. Así mismo, emplearon los ensayos de la capacidad atrapadora de radical oxígeno (ORAC) y de la capacidad reductora férrica (FRAP). El volumen de semen libre de gel de cada eyaculado se midió mediante un tubo graduado, la concentración de espermatozoides la evaluaron a partir de una gota de semen fresco mediante espectrofotometría, la movilidad espermática (MOV) se evaluó por microscopía de contraste de fase (Eclipse E200®, Nikon Inc., Tokio, Japón), la vitalidad espermática (VE) y la morfología anormal (MA) se evaluaron por la técnica de eosina-nigrosina modificada, la integridad funcional de la membrana plasmática (IM) de los espermatozoides lo evaluaron por la prueba hipoosmótica, El potencial de membrana interna mitocondrial (PMM) de los espermatozoides se evaluó mediante la sonda fluorescente catiónica JC-1 (Molecular Probes™, Waltham, USA).

En esta investigación encontraron que la suplementación con PS en el semen diluido en un medio de congelación genera un incremento de la CAT representada por FRAP; mientras no se observó el mismo efecto sobre la CAT evaluada mediante ORAC. Observaron una importante reducción de los parámetros espermáticos entre el semen fresco por efecto de la criopreservación, incluso con el uso de diferentes proporciones de PS en el semen diluido para la congelación. La suplementación con 20% de PS sobre la MOV del semen descongelado fue significativamente

diferente en comparación con el control sin PS. Sin embargo, la adición de PS no generó efecto alguno sobre la morfología, la vitalidad o la integridad funcional de la membrana plasmática. Esto podría explicarse por la variabilidad en la composición del PS de los reproductores, toda vez que, en estudios previos observaron que diferentes niveles de proteínas, vitaminas y iones presentes en el PS influyen, no solo en la calidad del semen fresco, sino también en la calidad del semen criopreservado cuando se adiciona PS. En este estudio, Restrepo y compañía hallaron correlaciones positivas entre los niveles de PMM altos, así como con la MOV de los espermatozoides. Estos resultados muestran que la modulación de la actividad mitocondrial puede ser importante en la mitigación de los impactos deletéreos de la congelación, toda vez que se conoce que el daño de la membrana plasmática da como resultado la pérdida irreversible de la capacidad de fertilización de los espermatozoides.

Resultados de fertilidad con diferentes diluyentes

Los resultados de fertilidad con la utilización de semen congelado difieren ampliamente, sin embargo, se evidencian avances científicos importantes que hacen que la criopreservación sea una alternativa viable y promisorio. Se recomienda depositar el semen congelado, de manera profunda, en el cuerno uterino para ayudarle a su avance hacia el oocito. Con la inseminación intrauterina profunda, a dosis de 25 millones con semen centrifugado por la técnica de Percoll, se han obtenido porcentajes de preñez entre el 30 y 60 %. Si el semen es de buena motilidad (42 %) o baja de motilidad progresiva (27%) pos-descongelación, se obtiene 63,3 y 28,6 % de preñez, respectivamente (Castro y Chacón, 2016).

Tabla 5*Porcentajes de preñez correspondientes al uso de diferentes diluyentes*

Crioprotectores	Porcentaje de preñez
INRA82® (lactosa) congelado	40%
INRA82® (lactosa) recongelado	10%
Botu-Crio Botupharma, Botucatu, (yema de huevo) caballo alta fertilidad	80%
Botu-Crio Botupharma, Botucatu, (yema de huevo) caballo baja fertilidad	21,4%
INRA96® + 2% yema de huevo + 2.5% glicerol	70%
INRA82® + 2% yema de huevo + 2.5% glicerol	41%

Nota. Adaptado de: ASPECTOS GENERALES DEL PROCESO DE CONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO: UNA REVISIÓN DESDE LA CONGELACIÓN ESPERMÁTICA, Castro y Chacón, 2016, Conexión Agropecuaria Vol. 6. Colombia.

Aún persisten sementales que congelan mejor con un diluyente o un crioprotector específico, estas individualidades son muy comunes, lo que no ocurre tan frecuente en bovinos. Sin embargo, ya es posible ofrecer semen sexado equino en pajillas de 0.25 o 0.5 mL. Persiste el inconveniente de la corta viabilidad del semen posterior a la descongelación y, por lo tanto, la necesidad de seguir de cerca el celo de la yegua e inseminar muy cercano a la ovulación.

Revisión sistemática y analítica

Se realizó una revisión de literatura a partir del año 2017, de manera sistemática mediante los descriptores (palabras claves): congelación, semen, equino y diluyente (Descriptores en Ciencias de la Salud-DeCS) y Semen Preservation (Medical Subject Headings-MeSH) considerando artículos científicos donde se tenga en cuenta el uso de diluyentes en el semen en equinos, ventajas, desventajas, tipos y usos, en las siguientes bases de datos: Google Scholar, PubMed, Scielo, science direct, web of science.

- Criterios de inclusión: artículos científicos que contengan las palabras claves diluyentes de semen en equinos, ensayos clínicos (experimentos de campo o de laboratorio), información acerca del uso de diluyentes y resultados del uso de estos.
- Criterios de exclusión: artículos sin relevancia en el título y el resumen, estudios sin resultados en cuanto a efectividad del uso de diluyentes, estudios que no contengan datos originales

Conclusiones

- La combinación de antioxidantes como L-ergotioneína y quercetina junto al inhibidor H89 aparte de brindar una reducción del estrés oxidativo disminuyen la peroxidación lipídica en el espermatozoide equino criopreservado, gracias a esto se puede potencializar la capacidad antioxidante de estas moléculas, sin embargo, según los datos revisados se encontró estas combinaciones muestra efectos contrastantes entre la cinemática y su capacidad antioxidante, alterando la primera, pero favoreciendo la segunda.
- La adición de plasma seminal a los diluyentes se ha considerado una buena alternativa para el mejoramiento de la calidad espermática debido a que aumenta la capacidad antioxidante total y enzimática del semen equino, más, sin embargo, se debe mencionar que

produce una reducción posdescongelación del potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides.

- La adición de CoQ-10 a una concentración de 1 mmol al diluyente de congelación conserva de manera más efectiva la funcionalidad mitocondrial y el citoesqueleto de actina de los espermatozoides sometidos al proceso de criopreservación

- Teniendo en cuenta lo anterior, la quercetina es el antioxidante de primera elección para aumentar la capacidad antioxidante total de los diluyentes para la congelación del semen equino, no obstante, la selección de un antioxidante que permita el retardo de la criocapacitación debido a la formación de EROS/ERNS, se convierte en un reto pues se desconoce las EROS involucradas y la dosis de antioxidante a usar.

- Independientemente de las limitantes que presenta el uso de la yema de huevo, no es favorable el uso de compuestos de origen vegetal como la lecitina de soya en los diluyentes convencionales debido a que estos no brindan la protección necesaria ante el estrés o shock por frío que presentan los espermatozoides equinos durante el proceso de criopreservación.

- En esta revisión se evidencio que la dimetilformamida al presentar valores más bajos de criolesión por menor velocidad de enfriamiento, mayor porcentaje de motilidad y viabilidad, en comparación con los resultados obtenidos del uso del glicerol o goma xantrana, es el crioprotector penetrante de primera elección para la composición de diluyentes convencionales o modificación de diluyentes comerciales.

- En cuanto al uso de crioprotectores no penetrantes como la trehalosa se evidencio que no muestra efectos protectores sobre la célula espermática durante el proceso de congelamiento.

- Los resultados analizados demostraron que la evaluación seminal y los parámetros cinemáticos fueron significativamente mayores en muestras de semen diluidas con diluyentes comerciales con composiciones químicamente definidas. El diluyente INRA -96® y Botu-

Crio® preservaron mejor la integridad de la membrana espermática a comparación de INRA - 82®, Lactosa – EDTA y Botusemen Gold®, más sin embargo BotuSemen Gold® mantuvo valores de motilidad ligeramente más altos que los demás diluyentes comerciales.

Recomendaciones

- El desarrollo de esta revisión de literatura permitió identificar las principales consecuencias producidas durante el proceso de criopreservación del semen equino y evidenció la importancia de realizar estudios que permitan encontrar alternativas de compuestos que se puedan adicionar a los diluyentes con el fin de minimizar los daños en las muestras obtenidas.

- La evaluación de los componentes que conforman los medios de congelación es crucial para poder identificar los efectos positivos que pueden atribuir a la conservación del semen equino, así se podrá potencializar estos efectos y aumentar la calidad del semen criopreservado frente a la calidad del semen fresco y/o refrigerado.

- La optimización de los diluyentes para la congelación de semen equino busca garantizar la máxima viabilidad y fertilidad posible del semen criopreservado. Este concepto es fundamental, debido a que la inseminación artificial con semen criopreservado cumple un importante papel en el uso de caballos de fenotipo superior en los programas de mejoramiento genético y facilita el comercio nacional e internacional de semen equino.

Referencias

Acosta, M. (2021). Evaluación de la integridad y funcionalidad espermática postdescongelación del caballo criollo colombiano mediante el uso de antioxidantes y un inhibidor de la capacitación. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

Alvarenga, M. A., Papa, F. O., & Ramires Neto, C. (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 32(3), 521–530.

Álvarez, C., Gil, L., González, N., Olaciregui, M., Luño, V. (2014). Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96® extender. *Cryobiology*, 69(1), 144–148.

Battut IB, Kempfer A, Lemasson N, Chevrier L, Camugli S. (2017). Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology*, 15;97:186-200.

Caldevilla, M., Ferrante, A., Neild, D. (2020). Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino. *InVet*, 22(1), 41-49.

Castro, J., Chacón, L. (2016). Aspectos generales del proceso de conservación de semen equino: una revisión desde la congelación espermática ciencias veterinarias. *Conexión Agropecuaria*, 6(1), 45-64

Chamba-Ochoa, H., Benítez, E., Jiménez, L., Castillo, F., Vidal, P. (2017). Inseminación artificial a tiempo fijo en asnas utilizando semen equino fresco y refrigerado. *REDVET - Revista electrónica de Veterinaria*, 18(10), 1-10

Consejo Equino Asnal y Mular (CEAM). (2014). Acuerdo de competitividad cadena equina, asnal y mular en Colombia.

<https://sioc.minagricultura.gov.co/Equino/Normatividad/Acuerdo%20de%20Competitividad%20de%20la%20Cadena%20Equina,%20Asnal%20y%20Mular.pdf>

Contexto Ganadero. (2023). Diferencias entre el semen fresco, refrigerado y congelado. <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/diferencias-entre-el-semen-fresco-refrigerado-y-congelado>

Contreras, M. J., Arias, M. E., Fuentes, F., Muñoz, E., Bernecic, N., Fair, S., Felmer, R. (2023). Cellular and Molecular Consequences of Stallion Sperm Cryopreservation: Recent Approaches to Improve Sperm Survival. *Journal of equine veterinary science*, 126, 104499. Advance online publication

Del Campo, R. (2023). Diluyente semen equino fresco. <https://www.rafaeldelcampo.com/producto/MIN13570-0301>

Dellepiane, H., Chilge, S., Vexelman, D., Ugarelli, A., Evangelista, S., Santiani, A., (2015). Evaluación de viabilidad e integridad acrosomal y actividad mitocondrial en semen refrigerado de caballo peruano de paso. Reporte preliminar. *Spermova*, 5(1),38 – 41

Duque C, Juan Esteban, Rojano, Benjamín A, & Restrepo B, Giovanni. (2017). Criotolerancia de Semen Equino Congelado con Aditivos en el Diluyente. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(1), 120-129

Ferreira-Silva, J. C., Basto, S. R. L., Moura, M. T., Rocha, J. M., Freitas Neto, L. M., Santos Filho, J. P., Silva Filho, M. L., Oliveira, M. A. L. (2018). Freezing of Stallion Semen: *In Vitro* Evaluation of Motility and Acrosin Activity in Sperm Cells Cryopreserved Using Different Semen Extenders. *Biopreservation and biobanking*, 16(6), 439–443

Ferreira, H. N., Ferreira-Silva, J. C., Rocha, J. M., Ramos-Deus, P., Travassos Ribeiro, J. I., Moura, M. T., Santos Filho, J. P., Lemos Oliveira, M. A. (2019). Functional Assessment of Diluent Choice for Semen Cryopreservation from Stallions with High and Low Freezability. *Acta Scientiae Veterinariae*, 47(1), 1-7

Gardón, J., Satué, K. (2023). History of Horses and the Biotechnologies Applied to Its Reproduction. Chapter. En: Biotechnologies Applied to Animal Reproduction. Current Trends and Practical Applications for Reproductive Management. Intechopen.

Gheller, S. M. M; Corcini, C. D; Santos, F. C. C; Tavares, G. C; Costa, V. G. G; Curcio, B. R; Nogueira, C. E. W; Varela Junior, A. S. (2019). The effects of xanthan gum on equine sperm quality during cooling storage. *Arq. bras. med. vet. zootec. (Online)*; 71(1), 28-34

Gutiérrez, L. (2014). Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Lançon, R., Celeghini, E. C. C., Giuli, V., de Carvalho, C. P. T., Zoca, G. B., Garcia-Oliveros, L. N., Batissaco, L., Oliveira, L. Z., de Arruda, R. P. (2021). Coenzyme Q-10 improves preservation of mitochondrial functionality and actin structure of cryopreserved stallion sperm. *Animal reproduction*, 18(1), e20200218.

Larentis, G., Bastos, H. (2020). Equine semen biotechnology. Chapter 2. En: Berhardt, L. *Advances in Medicine and Biology*. Nova Science Publishers, Inc.

Lozano Benito, D., Gil Huerta, L., & Álvarez San Martín, C. (2011). Efecto de la adición de plasma seminal en el semen equino descongelado. *Sanidad Militar*, 67(3), 284-290

Malagón, N., Pino, M., Pérez, J., Bonilla, M., Bulla, G. (2013). Evaluación de la inseminación artificial profunda con dosis bajas de semen refrigerado en yeguas de silla argentina y Criollo Argentina en condiciones del trópico alto. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 6,93-99

Ochoa, J. Álvarez, D. (2022). *Efecto crioprotector de la dimetilformamida, glicerol y su*

combinación sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador.

Peña FJ, García BM, Samper JC, Aparicio IM, Tapia JA, Ferrusola CO. (2011). Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols?. *Theriogenology*, 76(7),1177-86.

Pérez Q, Daniel Domingo, Acosta L, Mariano, Restrepo B, Giovanni, Camacho, Cesar, Pérez O, Jair. (2017). Congelación de semen equino bajo dos esquemas de adición de dimetilformamida. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(4), 918-927.

Prien, S., Iacovides, S. (2016). Cryoprotectants & Cryopreservation of Equine Semen: A Review of Industry Cryoprotectants and the Effects of Cryopreservation on Equine Semen Membranes. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 3(1), 00063

Rangel, E. (2023). Análisis de técnicas de congelación de semen equino empleadas en la actualidad. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Antonio Nariño. Bogotá, Colombia.

Rečková, Z., Filipčík, R., Soušková, K., Kopec, T., Hošek, M., & Pešan, V. (2022). The efficiency of different types of extenders for semen cooling in stallions. *Animal bioscience*, 35(5), 670–676.

Remezovski, N., Rearte, R. (2019). Criopreservación de semen Equino: efecto de Trehalosa y Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) adicionados a un diluyente base. XXVII Jornadas de jovens pesquisadores. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Restrepo Betancur, Giovanni, Usuga Suarez, Alexandra, Montoya Páez, Juan David, Celis, Álvaro David, & Henao, Andrés Antonio. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista Lasallista de Investigación*, 11(2), 63-70

Restrepo B, Giovanni, Pizarro L, Edison, Rojano, Benjamín A. (2019). Aporte antioxidante del plasma seminal y su efecto sobre la calidad del semen equino congelado. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1), 276-287.

Sharafi M, Borghei-Rad SM, Hezavehei M, Shahverdi A, Benson JD. (2022). Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges, Applications, and Prospective Strategies. *Animals*, 2(23):3271.

Sieme, H., Harrison, R. A., Petrunkina, A. M. (2008). Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal reproduction science*, 107(3-4), 276–292

Stapper, C. (2018). Cuál es el aporte de los equinos al progreso económico colombiano. Portafolio. <https://www.portafolio.co/negocios/cual-es-el-aporte-de-los-equinos-al-progreso-economico-colombiano-520174>

Treulen, F., Aguila, L., Arias, M. E., Jofré, I., Felmer, R. (2019). Impact of post-thaw supplementation of semen extender with antioxidants on the quality and function variables of stallion spermatozoa. *Animal reproduction science*, 201, 71–83