

**Criopreservación seminal en equinos: Efecto de la Trehalosa sobre la célula espermática**

Seminal cryopreservation in equine: Effect of Trehalose on the sperm cell

**Remezovski Luzko Nadia<sup>1</sup>**

**Azcurra, Miriam<sup>2</sup>**

**Benitez, Norma Beatriz<sup>3</sup>**

**Miragaya Marcelo<sup>4</sup>**

**Stornelli Maria Alejandra<sup>5</sup>**

Artículo Recibido: 14/02/2018.

Aceptado para Publicación: 15/03/2018.

**Resumen:** En los últimos años, el desarrollo de las técnicas de criopreservación de semen en el equino ha permitido congelar semen de padrillos con escasa tolerancia a la criopreservación. La composición del diluyente utilizado es uno de los factores críticos en la congelación espermática, ya que de ella depende que la célula espermática resista el descenso de temperatura a la que es sometida. Los disacáridos entre ellos la trehalosa, incorporada al diluyente de congelación ejerce un efecto osmótico y protege las membranas celulares en semen de varias especies por medio de su acción estabilizante. En el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de trehalosa TREA0; T1,6 (0,156%); T3,3 (0,312%); T6,3 (0,624%), incorporada a un diluyente de congelación lactosa-EDTA- yema de huevo, sobre la supervivencia espermática a la descongelación. Se evaluó el efecto protector de trehalosa a través de pruebas realizadas in vitro (motilidad, [MI] vigor [VI], vivos muertos [PV], prueba de HOS y acrosomas intactos [AI]). Se observaron diferencias significativas en todos los parámetros (MI,VI, PV, prueba de HOS y AI) entre el semen fresco y el semen congelado-descongelado ( $69\pm 1$  vs  $33\pm 1,5$ ; 4 vs 3;  $89\pm 0,5$  vs  $65\pm 1,5$ ;  $53\pm 1,5$  vs  $27\pm 1,2$ ;  $84\pm 0,7$  vs.  $62\pm 1,7$ ;  $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias en ninguno de estos parámetros seminales al comparar los diferentes diluyentes post-descongelación. Futuros estudios permitirán conocer si el agregado de mayores cantidades de trehalosa ejerce efectos protectores sobre la célula espermática en los procesos de congelación.

**Palabras clave:** Equino, criopreservación, semen, célula espermática.

**Abstract:** In the last years, equine semen cryopreservation development allowed the use of this technique in stallion semen with low cryopreservation resistance. The extender composition is one of the most important factor in the cryoprotection process. Trehalosa added on the extender produce an osmotic effect and protect the membranes in several species. The aims of this study was determinate the effect of different trehalosa concentration in a lactose-EDTA egg yolk extender TREA0 (0%); T1,6 (0,156%); T3,3 (0,312%); T6,3 (0,624%) on the frozen-thawed sperm cells survival. The following tests were performed on fresh and frozen-thawed semen motility (MI, % motile), velocity (VEL, 0-5), vital stain (VS, % alive), plasma membrane integrity (hypo-osmotic swelling test [HOS], % intact), acrosome morphology (AM, % intact). Sperm characteristics were analyzed by least squares analysis of variance using the GLM procedure. Differences were observed between fresh and frozen-thawed semen (MI,VI, VEL, HOS and AI;  $69\pm 1$  vs  $33\pm 1,5$ ; 4 vs 3;  $89\pm 0,5$  vs  $65\pm 1,5$ ;  $53\pm 1,5$  vs  $27\pm 1,2$ ;  $84\pm 0,7$  vs.  $62\pm 1,7$ ;  $p < 0.05$ , respectively). More studies will be necessary to know if higher trehalosa concentration show protect effect on sperm cells during cryopreservation.

**Keywords:** Stallion, criopreservación, semen, sperm cell.

---

<sup>1</sup> Becario de Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, **BECAL PARAGUAY**. E-mail: [nadiareme@hotmail.com](mailto:nadiareme@hotmail.com)

<sup>2</sup> Docente de la Cátedra de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. E-mail: [azcurram@yahoo.com.ar](mailto:azcurram@yahoo.com.ar)

<sup>3</sup> M.V. Estancia la República, Lujan. E-mail: [n\\_91benitez@hotmail.com](mailto:n_91benitez@hotmail.com)

<sup>4</sup> Profesor del área de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. E-mail: [mmirag@fcv.uba.ar](mailto:mmirag@fcv.uba.ar)

<sup>5</sup> Profesor Asociado de la Cátedra de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. E-mail: [astornel@fcv.unlp.edu.ar](mailto:astornel@fcv.unlp.edu.ar)

## **INTRODUCCIÓN**

La criopreservación de semen permite el almacenamiento del material genético por un periodo de tiempo indefinido, pudiendo el semen de un reproductor ser usado inclusive después de su muerte mediante tecnologías de reproducción asistida como la IA o en caso de semen de baja calidad o escasa disponibilidad espermática ICSI pudiendo optimizarse el uso del semen de un semental.

Se ha observado en reproductores el efecto de la heredabilidad sobre la fertilidad. En los animales de producción la selección por fertilidad ha impulsado la mejora en la calidad seminal. Por el contrario, los equinos han sido seleccionados a través del tiempo por su rendimiento deportivo o por un fenotipo característico dependiendo de la raza, y no en relación a su fertilidad. De la misma forma el humano se ha reproducido a través del tiempo independientemente de la calidad seminal, hecho profundizado por el uso de biotecnologías. (Alvarenga, 2014; Gibb, 2016). Esto se ve reflejado en la calidad de semen y fertilidad de la especie, lo cual ha estimulado el estudio de la criopreservación de semen en el equino. Por tal motivo se ha impulsado el estudio y desarrollo de crioprotectores alternativos adicionados a los diluyentes de congelación de semen que permitan mejorar la protección celular durante los procesos de criopreservación y así obtener mejoras en la calidad del semen congelado descongelado.

Debido a la gran variabilidad entre padrillos en relación a la resistencia y respuesta del eyaculado a los diferentes medios y procesos de criopreservación, la realización de pruebas de diluyentes para evaluar la congelabilidad seminal se ha convertido en una estrategia para obtener mejores parámetros seminales al descongelado (Loomis, 2008; Hofman, 2011; Gomes, 2002).

Uno de los componentes principales de los diluyentes son los azúcares. El efecto que causan sobre la célula espermática dependerá del tipo de azúcar que se utilice, ya que ejercen diferente función en el diluyente. Los monosacáridos son utilizados como fuente de energía ya que pueden penetrar en las células espermáticas y debido a que estas células no almacenan glucosa, la principal fuente de energía son los carbohidratos del sustrato extracelular (Palma, 2001). Es así que los monosacáridos son utilizados como fuente de energía para generar el movimiento flagelar por medio de la glycolisis y la fosforilación oxidativa mitocondrial (Liu, 2011; Naig, 2010).

Los disacáridos (Lactosa, sucrosa, trehalosa) (Aman, 1987) son azúcares no penetrantes que al ser incluidos en el diluyente producen hiperosmolalidad del mismo, es decir en el medio extracelular, permitiendo la deshidratación celular, evento esencial para que la célula pueda congelarse sin la formación de grandes cristales intracelulares causantes de ruptura de las membranas celulares.

La trehalosa, se ha estudiado como agente cryoprotector incluido en diluyentes para congelación de semen en varias especies, ya que además de su efecto osmótico, presenta otras funciones tales como la estabilización de las membranas. Durante el descenso de temperatura se produce un cambio de fases desde el estado líquido al cristalino, lo cual disminuye la fluidez de las membranas celulares. Esto lleva a un reordenamiento de los fosfolípidos y agregación de proteínas resultando en una inestabilidad de membrana con tendencia de los fosfolípidos a formar estructuras hexagonales que provocan en la membrana canales hidrofílicos y la vuelven más permeable a iones y otras moléculas (Aman, 1987). La interacción de la trehalosa con las cabezas de los fosfolípidos permitiría un ordenamiento laminar de la bicapa lipídica disminuyendo la formación de estructuras hexagonales (Crowe,

1988) y reduciendo las interacciones Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas (Aisen, 2002).

La trehalosa requiere una capa completa de agua interfacial para ejercer su acción cryoprotectora en forma efectiva. Esta acción se ve influenciada por la diferente composición del medio en la que se encuentra, principalmente si este contiene  $Ca^{++}$ . El  $Ca^{++}$ , interactúa con la interfase lipídica desplazando parte del agua interfacial y disminuyendo la eficiencia cryoprotectora de la trehalosa (Bakás, 1991). Aisen y col. (2000) realizaron estudios en carneros sobre el efecto de la trehalosa agregada a un diluyente de congelación seminal que contenía EDTA observando un efecto benéfico durante la criopreservación al combinar trehalosa y EDTA.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por el metabolismo espermático aumentan debido al estrés osmótico que sufre la célula durante los procesos de congelación y descongelación. Con el uso de las Amidias como cryoprotectores penetrantes para el semen equino, se ha logrado reducir el estrés osmótico ya que poseen menor peso molecular que el glicerol comúnmente usado en la criopreservación (Alvarenga, 2014) (Alvarenga, 2005) (Gomes, 2002). La trehalosa actúa disminuyendo el daño producido por radicales libres de oxígeno (Elbein, 2003), debido a que disminuye la peroxidación de lípidos y el consumo de glutatión (Aisen, 2005).

Considerando que los procesos de criopreservación causan daños estructurales irreversibles sobre la célula espermática y que este proceso disminuye la proporción de células viables del eyaculado, el efecto estabilizador de membrana que poseen los disacáridos disminuiría la población celular de espermatozoides no viables al descongelado mejorando la fertilidad del semen congelado-descongelado y prolongando la vida útil del eyaculado.

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de trehalosa que no modifiquen la osmolaridad del diluyente base, sobre la calidad espermática al descongelado en espermatozoides equinos. La hipótesis fue que la incorporación de trehalosa a un diluyente que contiene un crioprotector penetrante (dimetilformamida) y un crioprotector no penetrante (lactosa) ejercerá un efecto osmótico y estabilizará las membranas mejorando la supervivencia espermática al descongelado.

## **METODOLOGÍA**

**1. Animales Experimentales:** Se utilizaron 8 padrillos de raza Criolla Argentino de entre 5 y 8 años, clínicamente sanos y fértiles con descendencia en la últimas 3 temporadas reproductivas. Los animales se alojaron en boxes, con salidas diarias a piquetes, se alimentaron con dieta balanceada y tuvieron acceso libre al agua. Como criterio de aceptación de un macho como animal experimental, se tomaron los siguientes parámetros seminales: Concentración (CON)  $\geq 170 \times 10^6/ml$ , Motilidad Progresiva (MOT)  $\geq 60\%$ , Vigor (VIG)  $\geq 3-4$ , (Porcentaje de espermatozoides vivos) PV  $\geq 60\%$ , Porcentaje de acrosomas normales (ACR)  $\geq 60\%$ , Morfología espermática (ME) espermatozoides normales  $\geq 60\%$ , HOS  $\geq 60\%$  de colas enrolladas (Sieme, 2009; Juhász J., 2000)

**2. Colecta de Semen:** Los eyaculados fueron obtenidos a través de estimulación con una yegua en celo durante la estación reproductiva (Septiembre-Diciembre), recolectándose el semen en una vagina artificial tipo Missouri (Estrada 2007).

**3. Evaluación de la calidad seminal:** Las muestras de Semen fresco fueron sometidas a las siguientes pruebas de evaluación:

**3.3.1 Motilidad Individual (MI)** una gota de 10  $\mu$ l de semen fresco se colocó en un portaobjetos limpio a 37°C, se cubrió con un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X; utilizando platina termostatzada, se estimó en varios campos el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (Estrada, 2007).

**3.3.2 Vigor:(VI, escala 1-5)** una gota de 10  $\mu$ l de semen fresco se evaluó en un portaobjetos limpio a 37°C, con un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X, en varios campos el tipo de movimiento individual (Saacke, 1982) (Estrada, 2007).

**3.3.3 Evaluación de Integridad de membrana. Porcentaje de vivos (PV)**, se colocó 10  $\mu$ l de semen con 10  $\mu$ l de colorante eosina-azul de anilina sobre un portaobjetos a 37°C. Se mezclaron las gotas durante 30 segundos sobre platina térmica a 37°C. Se realizó un extendido y se observó por microscopía a 1000 X (Estrada, 2007) (Tittarelli, 2006).

**3.3.4 Prueba de HOS (HOS)**. Se evaluó la funcionalidad de la membrana espermática mediante la prueba de HOS agregando 100  $\mu$ l de semen a 1000  $\mu$ l de una solución de 50mOsm de Lactosa. Se observó con microscopio de contraste de fase a 400 X y se determinó el porcentaje de espermatozoides con colas enrolladas (Neild, 1999; Neild, 2000; Wrench, 2010).

**3.3.5 Acrosomas intactos (AI, % de acrosomas normales)**, una muestra de semen se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de *Pisum sativum* aglutinin-isotiocianato de fluoresceína (Mendoza, 1992; Zhuangyuan, 2015).

**4. Diseño experimental:** Se procesaron 16 eyaculados. El semen puro se filtró, y se determinó el volumen. Se tomó una alícuota para determinar la concentración espermática (CE  $10^6$ /ml), la cual se calculó realizando el conteo en cámara de Neubauer (Samper, 2009) este parámetro permitió realizar la dilución para el procesamiento de las muestras y la congelación (Juhász, 2000). Luego, el semen se diluyó a una concentración de  $50 \times 10^6$ /ml en un diluyente (DIL) KENNY (Palma, 2001; Samper, 2009), se fraccionó en tubos Falcon de 50 ml, se centrifugó a 275 G por 7 minutos (Cochram, 1984; Magistrini, 2000; Squieres, 2004), se descartó el sobrenadante y fue re-diluido en los diferentes diluyentes de congelación. Para realizar la congelación de semen se utilizaron cuatro diluyentes DIL (n=4) diferentes utilizando como base el DIL Lactosa-EDTA- yema de huevo (Glucosa 59,985 g, Citrato de sodio, 2 H<sub>2</sub>O 3,7 g, EDTA disódico 3,699 g, Bicarbonato de sodio (NaCO<sub>3</sub>H) 1,2 g. Polimixina B sulfato 1 millón UI) con 20% de yema de huevo, 11% de lactosa, 5% de DMF. Al mismo se le agregaron concentraciones crecientes de trealosa: 0% de trealosa [TREA0]; 0,156% de trealosa (1,65 mOsm; [TREA1,6]), 0,312% de trealosa (3,3 mOsm; [ TREA3,3]); ó 624% de trealosa (6,3 mOsm; [TREA6,3]). Dos eyaculados (EYA) de cada padrillo se fraccionaron y mezclaron con un volumen calculado de cada uno de los DIL descriptos para obtener una concentración final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Luego del envasado en pajuelas de 0,5 ml, el semen se equilibró 1,5hs a 4°C y posteriormente se congeló sobre vapores de nitrógeno líquido (Melo, 2007; Gomes 2002; Cochram, 1984). La descongelación del semen se realizó a 37 °C durante 1 minuto. El semen congelado-descongelado fue sometido a las mismas pruebas de contrastación microscópica que el semen fresco

**5. Análisis Estadístico:** Se analizaron las características espermáticas del semen fresco y al descongelado mediante análisis de varianza. El modelo matemático incluyó el efecto equino, eyaculado anidado dentro de equino, diluyente e interacción equino por diluyente y eyaculado por diluyente anidado dentro de equino.

## RESULTADOS

Se observaron diferencias significativas en todos los parámetros (MI,VI, PV, HOS y AI) entre el semen fresco y el semen congelado-descongelado ( $69\pm 1$  vs  $33\pm 1,5$ ,  $4$  vs  $3$ ,  $89\pm 0,5$  vs  $65\pm 1,5$ ,  $53\pm 1,5$  vs  $27\pm 1,2$ ,  $84\pm 0,7$  vs.  $62\pm 1,7$ ;  $P < 0,05$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias en ninguno de estos parámetros seminales al comparar los diferentes diluyentes (Tabla 1).

**Tabla 1.** Pruebas de contrastación realizadas al semen fresco y congelado-descongelado.

	MOT	VI	VM	HOS	ACRO
<b>Fresco</b>	$69\pm 1^a$	$4^a$	$89\pm 1,4^a$	$53\pm 1,5^a$	$84\pm 0,7^a$
<b>TREA0</b>	$34\pm 3,8^b$	$3^b$	$71\pm 1,5^b$	$34\pm 2,8^b$	$71\pm 1,7^b$
<b>TREA1,6</b>	$31\pm 4^b$	$3^b$	$64\pm 4^b$	$26\pm 3^b$	$58\pm 4^b$
<b>TREA3,3</b>	$37\pm 4^b$	$3^b$	$65\pm 3^b$	$30\pm 3^b$	$66\pm 3^b$
<b>TREA6,6</b>	$35\pm 3^b$	$3^b$	$64\pm 3,1^b$	$28\pm 2,1^b$	$61\pm 4,6^b$

Fuente: Valores obtenidos en las Pruebas de contrastación realizadas al semen fresco y congelado-descongelado. Valores expresados en promedios  $\pm$  error estándar. Letras diferentes expresan diferencias ( $p \leq 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio, se compararon cuatro diluyentes de criopreservación de semen distintos, con concentraciones de trehalosa definidas. Se observaron diferencias significativas en todos los parámetros (MI,VI, PV, HOS y AI) entre el semen fresco y el semen congelado-descongelado. Esto es esperable ya que las membranas espermáticas (plasmática y acrosomal) son el principal sitio de impacto de los procesos de criopreservación y donde ocurren los primeros daños celulares. Las bajas temperaturas ocasionan tanto daños estructurales como funcionales que afectan la capacidad fecundante del espermatozoide. Paralelamente, reducen su longevidad dando origen a cambios similares a la capacitación (Colebrader, 2011).

No se encontraron diferencias significativas en los diferentes parámetros evaluados in vitro cuando se comparó el efecto de los diferentes tratamientos sobre la célula espermática post descongelado. Es decir, que la trehalosa incorporada al diluyente de congelación en cantidades que no modifiquen la osmolaridad del medio, no mostró mejoras en los parámetros evaluados. El porcentaje de MI y de colas enrolladas en la prueba de HOS fueron similares entre sí al igual que el porcentaje de VI y de AI. Esto podría explicarse por el hecho de que el enrollamiento de la cola espermática ocurrido se produce a expensas de la membrana plasmática en el espermatozoide que posee la membrana intacta (Neild, 1999). En concordancia con este hecho, para que la célula pueda tener una motilidad rectilínea y progresiva los espermatozoides necesitan una estructura flagelar integra.

Los cambios ocurridos en la membrana acrosomal acortan la vida del espermatozoide haciendo necesario que la inseminación con semen congelado sea realizada cercana a la ovulación (Neild, 2003). En todos los diluyentes estudiados se observa que el porcentaje de AI se mantiene por encima del 60%, porcentaje que permite lograr tasas de preñez aceptables (Sieme, 2009). A su vez, si bien se observa que a la descongelación este valor es inferior en un diluyente en comparación con otros, esta disminución no desciende por debajo del 60%. Esta acción crioprotectora, no se puede atribuir a la capacidad estabilizadora de membrana de la trehalosa, ya que no se observan diferencias significativas entre los diluyentes conteniendo

trehalosa y el diluyente base sin trehalosa. Es probable que esta acción crioprotectora se deba a la presencia de lactosa como disacárido osmóticamente activo así como a la yema de huevo utilizada a altas concentraciones como protector del shock de frío (Strom Holst, 1998; Clulow, 2006; Aisen, 2002; Henry, 2002).

En varias especies se ha estudiado el efecto de la trehalosa sobre la célula espermática. En especies como el ovino la trehalosa adicionada al diluyente de congelación tiene la capacidad de estabilizar la membrana y ejercer un efecto osmótico crioprotector (Aisen, 2001; Aisen, 2000). Los autores antes mencionados observaron este efecto a través de estudios de microscopía electrónica concluyendo que la trehalosa es capaz de preservar la membrana plasmática y acrosomal principalmente a nivel de la cresta apical. En otras especies como en caninos altas concentraciones de trehalosa pueden provocar efectos deletéreos sobre la célula espermática (Savignone, 2007; Savignone, 2008; Stornelli, 2004). En caprinos la adición de trehalosa con un monosacárido como la glucosa mejora la calidad seminal post descongelado (Naig, 2010). Las diferencias observadas podrían deberse a la disímil repuesta a la criopreservación de los espermatozoides de las diferentes especies.

Henry y Col. (2002) evaluaron, en equinos, el efecto estabilizador de membrana de la trehalosa en un diluyente conteniendo dos crioprotectores: acetamida y metilcelulosa. Los mencionados autores encontraron que la motilidad post descongelado no disminuyó en la forma observada por Squires (2004). Este último autor incorporó grandes concentraciones de trehalosa (9mM) al diluyente base, buscando un efecto osmótico más que estabilizador de membrana, no encontrando efectos benéficos sobre el espermatozoide equino.

Podemos concluir que la trehalosa presentaría una interacción especie específica con la célula espermática, ya que dependiendo de la especie que se estudie ejercerá un efecto protector ya sea como estabilizadora de membrana o a mayores concentraciones como disacárido osmóticamente activo. En el presente estudio, no encontramos diferencias significativas en los parámetros estudiados entre los diferentes diluyentes de congelación. En la especie equina, más estudios serán necesarios para evaluar el efecto protector de la trehalosa en bajas concentraciones sobre la membrana espermática.

#### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aisen E.G., A. H. (2000). Effect of trhalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* (53), 1053-1061.
- Aisen, E. G., Quintana, M., Medina , V., Morello, H., & Venturino, A. (2005). Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose based hipertonic extenders. *Cryobiology*(50), 239-249.
- Aisen, E., Medina, V., & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post thawed fertility of ram semen in different trehalose concentration. *Theriogenology*(57), 1901-1808.
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., & Neto, C. R. (2014). Estrategies to improve the quality and fertility of stallion semen. *Spermova*, 2(4), 172-178.
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*(89), 105-113.
- Aman, R. P., & Pickett, B. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, 7(3), 145-173.
- Bakás, L. S., & Disalvo, E. (1991). Effect of Ca<sup>+</sup> on the cryoprotective action of trehalose. *cryobiology*(28), 347-353.

- Clulow, J. R., Maxwell, W. M., Evans, G., & Morris, L. H. (2007). A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Australian Veterinary Journal*, 6(85).
- Cochram, J., Amann, R., Froman, D., & Pickett, B. (1984). Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, 22(1).
- Colebrader, B. (2011). Techniques for Evaluating Frozen Semen. In McKinnon., *Equine Reproduction, Second Edition* (Vol. 2). Ames, Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., Rudolph, A., Wistrom, C. A., & Anchoroguy, B. S. (1988). Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*(947), 367-384.
- Elbein, A. D., Pan, Y., Pastusak, I., & Carroll, D. (2003). New insights om trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4).
- Estrada, A., & Samper, J. (2007). "Evaluation of Raw Semen". In J. En Samper, J. Pycock, & McKinnon, *Current Therapy in Equine Reproduction*. (Segunda ed., pp. 253-257). St. Louise, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Gibb, Z., & Aitken, J. R. (2016). Recents Developments in Stallion Semen Preservation. *ScienceDirect*(43), S29-S36.
- Gibb, Z., & Aitken, R. (2016). The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage:. (E. Baldi, Ed.) *BioMed Research International*, 2016, 8.
- Gomes, G., Jacob, J., Medeiros, A., F.O.Papa, & Alvarenga, M. (2002). Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*(58), 277-279.
- Henry, M., Snoeck, P., & Cottorello, A. (2002). Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology*(58), 245-248.
- Hofman, N., Oldenhof, H., Morandini, C., Rohn, K., & Sieme, H. (2011). Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified good or poor for freezing. *Animal Reproduction Science* (125), 112-118.
- Juhász J., N. P. (2000). Review Article: Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: a Review. *Acta Vet.*(69), 247–25.
- Liu., A. D. (2011). Spermatozoal motility. In McKinnon, *Equine Reproduction Second Edition*. St. Louise, Missouri, USA: Wiley Blackwell.
- Loomis, P. R., & Graham, J. K. (2008). Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal reproduction science*(105), 119-128.
- Magistrini, M. (2000). "Semen Evaluation". In J. Samper, *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. (Segunda ed., pp. 57-74). St. Louise , Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Melo, C. Z. (2007). Influence of Semen Storage and Cryoprotectant on Post-thaw Viability and Fertility of Stallion Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 4(27), 171-175.
- Mendoza C., C. A. (1992). Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using Pisum sativun agglutinin. *J. Reprod. Fertil*(95), 755-763.

- Naig, S. W., Wahid, H., Zuki, A. B., Mohd Azam K., R. Y., Kazhal, S., Bukar, M. M., . . . San, M. M. (2010). Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *ScienceDirect*(122), 23-28.
- Neild D., C. M. (1999). Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 4(51), 721-727.
- Neild D.M., C. M. (2000). The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrología*, 6(32), 351-355.
- Neild, D. M., Gadella, B. M., Chaves, M. G., Miragaya, M. H., Agüero, A., & Colenbrander, B. (2003). Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*(59), 1693-1705.
- Palma, G. A. (2001). *Biotecnologías de la reproducción*. Balcarce, BsAs, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Saacke, R. (1982). Components of semen quality. *Animal Science*(55), 1-13.
- Samper, J. C. (2009). *Equine Breeding Management and Artificial Insemination 2nd Edition*. S.T. Louise; Missouri: Saunders Elsevier.
- Savignone CA, J. S. (2008). Efecto de la trealosa en la estabilización de membranas en espermatozoides caninos criopreservados. *IX Jornadas de divulgación técnico-científicas. Facultad de Ciencias Veterinarias de Casilda*. Sta Fe.
- Savignone, C., Titarelli, C. M., Stornelli, M. C., Gimenez, F., De la Sota, R. L., & Stornelli, M. A. (2007). Criopreservación de Semen Canino. Aplicaciones y desarrollo. *Revista Veterinaria, de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay*, 42(167), 15-22.
- Sieme, H. (2009). Semen evaluation in Semper. In S. J.C., *Equine Breeding Management and Artificial Insemination* (Segunda ed., pp. 57-74). St. Louise, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Squieres EL, K. S. (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*(62), 1056-1065.
- Stornelli, M. A. (2004). Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado. *Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata*. La Plata, BsAs, Argentina.
- Strom Holst B, R. A.-B.-F.-M.-8. (1998). Canine sperm head damage after freezing-thawing. Ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod Dom Anim*,(33), 77-82.
- Tittarelli C.M., S. C. (2006). Effect of transport media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*, 66: 1637-1640.
- Vidament M, Y. J.-F. (2001). Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. *Animal Reproduction Science*, 68, 201-218.
- Wrench, N., Pinto, C., Klinefelter, G., Dix, D., Flowers, W., & Farin., C. (2010). Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. *Animal Reproduction Science*(119), 219-227.
- Zhuangyuan, W., Xinbiao, Z., Yongming, L., Fei, H., Hong, D., Guoting, Z., . . . Jingbo., C. (2015). Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combinations of cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*(163), 163.