

Criopreservación espermática mediante recuperación de espermatozoides de conductos deferentes y epidídimo en un equino: Reporte de caso

Sperm cryopreservation through the recovery of spermatozoa from the deferent ducts and epididymis in a horse: Case report

Recibido: 23 de agosto de 2024 • **Aprobado:** 17 de octubre de 2024

Sebastián Villamil, MVZ

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad De Ciencias y Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Bogotá, Colombia

E-mail: pvillamil@udca.edu.co

Jorge Pinzón, MV

Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia. Fundación Universitaria San Martín Bogotá, Grupo de investigación Prosavez. Bogotá, Colombia.

Ricardo Buitrago, MV MSc

Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia. Fundación Universitaria San Martín Bogotá, Grupo de investigación Prosavez. Bogotá, Colombia.

E-mail: edwin.buitrago@sanmartin.edu.co

Resumen

La criopreservación seminal es una herramienta biotecnológica mediante la cual los espermatozoides son sometidos a temperaturas de congelación (-196°C) con el fin de mantener su viabilidad por tiempo indefinido. Esta técnica es comúnmente utilizada en sementales cuando se requiere disponibilidad un suplemento constante de dosis seminales, o en algunos casos cuando se desea preservar la genética de un animal que ha sufrido lesiones severas o ha muerto recientemente. Este reporte describe la técnica de recuperación espermática mediante el lavado por flujo retrógrado del conducto deferente y cola del epidídimo en un semental Criollo Colombiano, el cual fue remitido a consulta posterior a una fractura con minuta en el miembro posterior izquierdo, razón por la cual fue realizada la eutanasia del paciente. Luego de haberse retirado los testículos se realizó recuperación espermática mediante lavado por flujo retrógrado del conducto deferente y la cola del epidídimo para ser sometidos a un protocolo de criopreservación convencional utilizando un diluyente con base en yema de huevo – metilformamida y glicerol. Se lograron obtener un total de 10 dosis seminales, con motilidad total de 60% postdescongelación. Esta técnica es una alternativa viable dado que permite conservar el mérito genético de animales de alto valor cuando estos han sufrido lesiones severas o han muerto recientemente, generando alternativas para la posterior aplicación de biotecnologías reproductivas.

Palabras clave: Equino, criopreservación, crioprotector, espermatozoide, epidídimo.

Introducción

La criopreservación seminal consiste en la congelación y almacenamiento de células espermáticas en nitrógeno líquido a temperaturas de

-196 °C generando una suspensión de su metabolismo por periodos de tiempo indefinidos, esto con el fin de preservar el material genético y tener a disposición dosis inseminantes para ser usadas posteriormente por medio de biotecnología

logías reproductivas (1). La extracción espermática ha sido reportada a través de técnicas como el uso de vagina artificial, preservativo, colector cervical, eyaculación química y extracción de espermatozoides de los conductos deferentes o de los epidídimos (2,3,4,5,6). La electroeyaculación no es una forma exitosa dada la ocurrencia de contaminación seminal con orina y el riesgo para el operario y el animal (4).

Actualmente se han utilizado diferentes métodos para la obtención de espermatozoides de la cola del epidídimo tales como: aspiración directa (7), colocación del epidídimo en medio gelificado durante periodos de tiempo específicos (8), y la realización de lavado por flujo retrogrado que involucra los conductos deferentes (9). El desarrollo de la técnica para extracción de espermatozoides del epidídimo tuvo su origen en 1930 por Walton, quien logró extraer espermatozoides vivos de los conductos deferentes y epidídimos en conejos. Posteriormente se realizaron estudios para la recuperación de espermatozoides en diferentes especies como ratones, ciervos, equinos, ovinos, caninos, felinos, bovinos, entre otros (8,9). En 1957, se reportó la primera obtención y criopreservación de espermatozoides colectados directamente de la cola del epidídimo con posterior inseminación de una yegua y nacimiento con éxito de un potro (10); En el 2014 se reporta la primera preñez en Colombia en un yegua producto de la inseminación con espermatozoides congelados que fueron recuperados de la cola del epidídimo (11).

Cada espermatozoide anatómicamente está compuesto por una cabeza que posee núcleo con ADN y un acrosoma que contiene enzimas hidrolíticas necesarias para la penetración de la zona pelúcida del óvulo durante la fertilización, la pieza intermedia y la pieza final poseen microtúbulos que lo ayudan en su movimiento. También cuenta con membrana plasmática, la cual encierra tanto la cabeza como la cola y se encarga de dar protección actuando como una barrera selectiva que regula el intercambio de sustancias entre el medio interno y el externo (12,13). Durante la espermatogénesis, los espermatozoides no están maduros cuando se liberan de los túbulos seminíferos, cada uno contiene una gota citoplasmática proximal en su pieza intermedia, la cual a medida que el espermatozoide avanza hasta la cola del epidídimo se va desplazando a la parte proximal del mismo y este debe madurar en la cola del epidídimo para ganar motilidad progresiva, estabilidad estructural y capacidad fecundante (12,14). Los principales cambios que ocurren durante el tránsito espermático a través del epidídimo

incluyen modificaciones en la cromatina (14) y alteraciones en el tamaño del acrosoma (15).

Los crioprotectores han sido clasificados en dos grupos según la permeabilidad de la membrana a la sustancia, los no penetrantes y los penetrantes de la membrana celular que poseen bajos pesos moleculares tales como glicerol, metanol, etilenglicol, 1,2-propanodiol, butanediol, acetamida, el dimetil sulfóxido (DMSO) y metilformamida (16,17). En equinos, entre los más reportados han sido los crioprotectores penetrantes, entre ellos el glicerol que junto a la adición de dimetilformamida han demostrado mejorar la motilidad postdescongelación y disminuido el daño en la membrana plasmática de los espermatozoides. (18,19)

Durante el proceso de criopreservación el espermatozoide se ve sometido a 2 alteraciones principalmente; cambios de temperatura y osmolaridad que afectan su anatomía, metabolismo y potencial fecundante. Particularmente durante los cambios de shock térmico de fase del medio acuoso a medio de gel se ocasionan daños en la estructura de la membrana fosfolípida alterando su permeabilidad y metabolismo (20,21,22). Durante la congelación se forma un medio extracelular hiperosmótico haciendo que el espermatozoide pierda agua con el objetivo de equilibrar el medio intra y extracelular. Al descongelamiento el espermatozoide se expone a una solución hipotónica en el medio extracelular, con lo cual se permite la entrada de agua por difusión pasiva, dichas alteraciones en la osmolaridad pueden alterar la membrana celular y la viabilidad espermática (23,24). La aparición del primer núcleo de hielo ocurre cuando la solución llega a temperaturas entre -5°C y -15°C , lo anterior promueve la formación de núcleos de mayor tamaño. La adición de crioprotectores evita la formación de cristales de hielo en el medio intra y extracelular (25) lo que favorece la reducción de agua intracelular, sin deteriorar las concentraciones intra y extracelular de iones (26). Asegurar un correcto protocolo de criopreservación es fundamental para no afectar el potencial fecundante del espermatozoide. Utilizando espermatozoides congelados provenientes de la cola del epidídimo las tasas de preñez reportadas han sido 17% (10); 24%, 46% (27) y pueden ir hasta el 66% (28).

El presente reporte de caso tiene como objetivo describir el proceso de criopreservación de espermatozoides equinos recuperados de las colas del epidídimo y conductos deferentes mediante el uso de la técnica de flujo retrógrado.

Descripción de caso

Anamnesis: Fue remitido a consulta un garañón de 6 años, raza Criollo Colombiano con una lesión en el miembro posterior izquierdo. Luego del examen clínico, se realizó una evaluación radiológica del miembro afectado mediante la cual se determinó una fractura conminuta en la tibia. Dada la gravedad del cuadro clínico y el pronóstico desfavorable se decidió efectuar eutanasia del paciente utilizando relajantes musculares y sedantes con xilacina y guayacolato de glicerilo, inducción de plano anestésico con ketamina y punción intratecal con lidocaína. Posterior a la muerte del equino, se realizó la extracción de los testículos y la criopreservación de espermatozoides obtenidos a partir de la técnica del ordeño epididimal por flujo retrógrado.

Recuperación Espermática: Posterior a la eutanasia, se realizó desinfección e incisión ventral de la piel escrotal, exteriorizando los testículos en su totalidad, permitiendo la realización del corte del escroto, túnica dartos, fascia escrotal, fascia espermática externa e interna y túnica vaginal parietal. Se realizó hemostasia por ligadura del plexo pampiniforme y de la arteria testicular en la porción más proximal alcanzada del cordón espermático previo al corte con el fin de tener una mayor longitud del conducto deferente disponible para el lavado retrógrado. Los testículos, epidídimos y conductos deferentes fueron introducidos en bolsas plásticas estériles, almacenados a 20°C y transportados inmediatamente a un laboratorio cercano para su procesamiento.

Los epidídimos y conductos deferentes fueron escindidos de cada testículo, colocados en cajas plásticas de 47 mm de diámetro (Caja de Petri, Kartell, Milán, Italia), y mantenidos a temperatura ambiente (20°C aproximadamente) durante el procedimiento (30 minutos). Cada conducto deferente fue cortado en fracciones de 4 – 6 cm de longitud, las cuales fueron canuladas con agujas de 25xG, unidas a jeringas plásticas (Medispo, Protex s.a) cargadas con 1 ml de medio de criopreservación con yema de huevo, metilformamida y glicerol (BotuCrio, Botupharma, Brasil). Cada una de las porciones de los conductos deferentes fue lavada mediante flujo retrógrado, y sus contenidos depositados en tubos cónicos de 50 ml (Tubo Falcon, Analytica, Bogotá, Colombia), los cuales fueron previamente cargados con 5 ml de medio de criopreservación a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron cortes longitudinales sobre la cola del epidídimo de cada testículo, para coleccionar

los espermatozoides usando una jeringa. Como resultado final del procedimiento, se obtuvieron un total de 15 ml de espermatozoides y diluyente.

Después de recuperar el material espermático, fue refrigerado durante 120 minutos bajando gradualmente la temperatura hasta alcanzar los 5 °C. Una vez completado este proceso, se procedió a empacar el semen en pajillas de 0.5 ml, estas fueron selladas con alcohol polivinílico para ser sometidas a vapores de nitrógeno líquido 4 cm por encima del nivel y finalmente sumergidas directamente en nitrógeno a -196 °C siendo almacenadas en un termo de nitrógeno (29,30,31).

Evaluación seminal pre y post criopreservación: Se determinó el porcentaje de motilidad total y progresiva en las muestras mediante observación directa, usando microscopía de luz convencional a 100 y 400X. Para esto, 10 µL de muestra fueron colocados sobre una lámina portaobjetos. La cuantificación de la motilidad fue realizada por el mismo observador, expresándose el resultado en un rango de 0 – 100%.

Morfología Espermática: Fue evaluada mediante microscopía óptica (1000x) utilizando 20 microlitros de eosina nigrosina mezclada con 20 microlitros del material recuperado y extendida a manera de frotis en una lámina portaobjetos. Se evaluaron las características externas de los espermatozoides (cabeza, pieza intermedia y cola) y se estimó en un total de 100 células contadas correspondiente a la cantidad de espermatozoides con morfología normal, así como las alteraciones en cabeza, acrosoma, gotas citoplasmáticas, defectos en pieza media y cola. Se asumió el resultado de normalidad como un estimado en porcentaje de los espermatozoides totales recuperados (13).

Concentración Espermática: A través de la cámara de Neubauer realizando una dilución de 1:800 entre agua destilada y el material obtenido. La cámara fue evaluada por microscopía óptica (400x), estimando la cantidad de espermatozoides presentes en 5 cuadros, luego su multiplicó por el factor de dilución y finalmente por una constante de 50.000 para expresar el resultado en millones de Spz/ml

Resultados

Las características espermáticas fueron observadas posterior a la recuperación con el diluyente (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de calidad seminal del material recuperado proveniente de las colas del epidídimo y conductos deferentes previo a la criopreservación.

ESPERMIOGRAMA GENERAL	
Parámetro	Valor
Volumen	15 ml
Motilidad Total	85%
Morfología	
Normales	86%
Cola enrollada	6%
Cabezas sueltas	3%
Gota Citoplasmática Distal	5%
Concentración	1,200*10 ⁶ Spz/ml

La evaluación del proceso de criopreservación se estimó tomando una pajilla al azar, descongelándola en baño de maría a 37°C durante 45 segundos (17) y depositando su contenido en un

tubo eppendorf de 1.5 ml (Tubo eppendorf, Kartell, Analytica). De allí, se obtuvo una muestra para evaluar la motilidad total a través de microscopía óptica (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados Evaluación Seminal Post-Descongelación

ESPERMIOGRAMA SEMINAL POST DESCONGELACIÓN	
Parámetro	Valor
Volumen	0,5 ml
Concentración	200 * 10 ⁶ Spz
% de espermatozoides móviles	50%
Motilidad Total	75%

La cantidad de dosis seminales se estimó a partir de los resultados postdescongelación. Teniendo en cuenta que la dosis seminal adecuada para inseminación contiene entre 250 a 500 *10⁶ Spz viables (32) y estimando una mortalidad de 50%

de Spz por el proceso de descongelamiento, se necesitan 5 pajillas con 100 *10⁶ Spz viables cada una para alcanzar una dosis seminal efectiva (500 *10⁶ Spz viables) (Tabla 3) (33,34,35).

Tabla 3. Cálculo de dosis seminales a partir de resultados de descongelación seminal.

FÓRMULA	CÁLCULO
Concentración * Volumen = Concentración total de Spz	1,200*10 ⁶ Spz/ml X 15 ml = 18,000*10⁶ Spz
Concentración total de Spz*%normales*% motilidad= Spz viables	18,000 10 ⁶ Spz*0,86*0,75= 11,610 Spz viables
Spz viables/concentración pajillas = Cantidad de pajillas a congelar	11,610*10 ⁶ Spz / 200*10 ⁶ Spz = 58 pajillas
3 pajillas = 1 dosis seminal	58 pajillas= 11 dosis seminales

Discusión

La criopreservación de espermatozoides permite preservar material seminal de alto valor gené-

tico, optimizar los eyaculados de los sementales además de reducir la transmisión de enfermedades venéreas (36). Para este caso es una opción viable para conservar material genético y

reproducir el semental cuando este no puede ser colectado por alguna condición física o ante una muerte repentina (28). El manejo de los testículos y el transporte hasta el laboratorio es determinante en el éxito de la criopreservación espermática a través del ordeño de las colas del epidídimo y lavado por flujo retrógrado de los conductos deferentes, algunos reportes han evaluado la viabilidad espermática después de la orquiectomía hasta 24 horas conservándolos a 5°C (28, 37), así como la posibilidad de mantener la viabilidad espermática hasta por 96 horas en refrigeración (3). En el presente reporte los testículos fueron transportados al laboratorio posterior a la eutanasia del paciente y la técnica fue realizada en un tiempo no mayor a 30 minutos disminuyendo el posible impacto negativo del tiempo sobre la viabilidad espermática.

Durante el proceso de espermatogénesis en la cola del epidídimo se almacenan espermatozoides maduros sin presencia de plasma seminal y con capacidad fecundante a diferencia de la cabeza y cuerpo donde reportan estadios inmaduros de los mismos (38). Para este caso, el material recuperado de la cola del epidídimo y conductos deferentes fueron principalmente células espermáticas y plasma epididimal debido a la ausencia de los componentes del plasma provenientes de las glándulas sexuales accesorias. Un estudio reportó que en camellos los espermatozoides provenientes de la cabeza y cuerpo del epidídimo son capaces de fecundar, aunque la mejor calidad es de los obtenidos de la cola del epidídimo (39). Se utilizaron espermatozoides que después de ser evaluados en su morfología y movilidad se asume que tienen propiedades para ser fértiles, aunque se hace necesaria la utilización de este semen en procesos de inseminación artificial como prueba biológica para asegurar el potencial fecundante del mismo.

Diferentes técnicas para la obtención de espermatozoides provenientes del epidídimo han sido reportadas, destacándose la aspiración directa, inmersión epididimal en gel durante un periodo de tiempo y flujo retrógrado de las colas del epidídimo que involucran también los conductos deferentes (3,4,40). Esta última, fue la seleccionada siendo una técnica efectiva que requiere poca manipulación, además, se realizaron cortes de la cola del epidídimo para aumentar la cantidad de material espermático recuperado obteniendo mayor cantidad de dosis seminales.

Los crioprotectores se clasifican en dos grupos y diversos autores reportan que los mejores re-

sultados de criopreservación espermática son obtenidos utilizando aquellos que penetran la membrana celular y poseen bajo peso molecular (41,18,42). Así mismo, se ha demostrado que la dimetilformamida (DMF) como crioprotector ofrece mejores resultados en cuanto a movilidad espermática post descongelamiento (18), siendo utilizado en este caso con una combinación de DMF + glicerol en un preparado comercial. En la actualidad no existe un protocolo estandarizado para la criopreservación de semen equino, encontrándose diversos métodos y materiales dependiendo del laboratorio, así como variabilidad en la respuesta a la congelación dependiendo del semental (43,22) Utilizando espermatozoides congelados provenientes de la cola del epidídimo las tasas de preñez reportadas han sido hasta del 70 %, lo que conlleva a considerar como opción adecuada el uso de esta herramienta biotecnológica (28).

Los protocolos de congelación espermática estas reportados de manera manual utilizando cajas de icopor y depositando las pajillas sobre vapores de nitrógeno líquido a 4 cm por encima del nivel (44), también existen congeladoras automáticas que disminuyen la temperatura de los espermatozoides de forma controlada a 10 °C por minuto hasta llegar a -15 °C y a 25 °C por minuto hasta -150 °C (Kryo 10-3.3; Messer Griesheim, Germany), en nuestro caso se utilizó la manera manual dejando en vapores durante 10 minutos y después sumergiendo de manera directa las pajillas en el nitrógeno líquido para posteriormente empacarlas y almacenarlas en nitrógeno líquido a -196 °C (45).

El efecto de la criopreservación sobre los espermatozoides define el daño celular como resultado de una alta concentración de solutos en el fluido extracelular causado por el shock térmico y la formación de cristales de hielo fuera de la solución (26) provocando así la ruptura de la membrana basada en la transición de fase termo trópica de los lípidos (46). De acuerdo con esta teoría, la supervivencia espermática depende del tiempo permitido para que ocurra el evento de separación de fases durante la congelación. Si este no ocurre, se pueden crear orificios en la membrana por fallas en el agrupamiento de los lípidos durante la descongelación (47). El otro efecto descrito se basa en la alta sensibilidad de la membrana plasmática postulando al estrés osmótico como el factor clave en la optimización de la velocidad de enfriamiento por la tasa de desplazamiento requerida por la membrana plasmática para acomodarse al cambio de volumen pudiendo estar relacionado con la tensión de la adhesión del citoesqueleto

(43). En el caso, los resultados post descongelación evidenció un 40% de espermatozoides sin movimiento, aunque no se puede determinar la causa de esta, las teorías expuestas anteriormente pueden sugerir posibles etiologías.

La dosis seminal fue ajustada en el análisis post descongelación de una pajilla al azar, calculando la cantidad de espermatozoides viables y asegurando una dosis de 500×10^6 Spz millones por inseminación teniendo en cuenta que los reportes sugieren de 250 a 500 millones de Spz (Householder et al., 1981), asimismo, se estimó la concentración por pajilla en 200×10^6 Spz (33,34,35). Cabe recalcar que un análisis computarizado de las pajillas nos podía ofrecer un diagnóstico más objetivo frente los parámetros de motilidad espermática, en este caso no fue realizado por no contar con el equipo apropiado y el interés del propietario de conservar todo el material genético. Como recomendaciones de uso seminal al momento de la inseminación se deben descongelar 5 pajillas (1 dosis) y esta debe ser realizada de manera profunda cerca de la unión útero-tubal utilizando un catéter flexible durante el periodo peri ovulatorio teniendo en cuenta las 6 horas antes o después de la ocurrencia de la misma.

Conclusiones

La recuperación espermática de las colas del epidídimo y conductos deferentes utilizando la técnica de ordeño epididimal por flujo retrógrado es una estrategia viable cuando el animal presenta un accidente que impide la colecta seminal o muere. Combinado este procedimiento con la criopreservación se puede almacenar el material seminal por un periodo de tiempo prolongado y ser utilizado en biotecnologías de reproducción.

Referencias

- Holt, W., Pickard, A., 1999. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev Reprod* 4. 143–50. https://scholar.google.com/citations?user=scholar?q=Role+of+reproductive+technologies+and+genetic+resource+banks+in+animal+conservation&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar
- Tiplady, C.A., Morris, L.H.A., Allen, W.R., 2002. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology* 58, 225–228. https://www.researchgate.net/publication/279893610_Stallion_epididymal_spermatozoa_Pre-freeze_and_post-thaw_motility_and_viability_after_three_treatments
- James, A.N., Green, H., Hoffman, S., Landry, A.M., Paccamonti, D., Godke, R.A., 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 h. *Theriogenology* 58, 401–404. <https://www.semanticscholar.org/paper/Preservation-of-equine-sperm-stored-in-the-at-4-%C2%BC-James-Green/77433a28af91fcd92bc4fb68d-055fe11f818fdc5>
- Cary, J.A., Madill, S., Farnsworth, K., Hayna, J.T., Duoos, L., Fahning, M.L., 2004. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can. Vet. J.* 45, 35–41. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC539225/>
- James, A.N., 2004. Preservation of sperm harvested from the rat, caprine, equine and bovine epididymis. PhD Thesis. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge, 229 pp. https://digitalcommons.lsu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2040&context=gradschool_dissertations
- Muradías, P.R., Weiss, R.R., Kozicki, L.E., Granemann, L.C., Santos, I.W., Pimpão, C.T., 2006. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo (Some viability parameters from equine spermatozoa harvested by artificial vagina and by epididymal tail washing). *Arch. Vet. Sci.* 11, 69–74. <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/7420>
- Sharma, R.K., Padron, O.F., Thomas, A.J., Agarwal, A., 1997. Factors associated with the quality before freezing and after thawing of sperm obtained by microsurgical epididymal aspiration. *Fertil. Steril.* 68, 626–631. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9341600/>
- Hewitt, D.A., Leahy, R., Sheldon, I.M., England, G.C.W., 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 67, 101–111. https://www.researchgate.net/publication/11932043_Cryopreservation_of_epididymal_dog_sperm
- Garde, J., Aguado, M., Perez, S., Garrido, D., Perez-Guzman, M., Montoro, V., 1994. Physiological characteristics of epididymal spermato-

- zoa from postmortem rams. *Theriogenology*. 41, 203. <https://www.semanticscholar.org/paper/Physiological-characteristics-of-epididymal-from-Garde-Aguado/fd180c-4d2883a02eae2987a12092cd5ed75ee1b5>
10. Barker, C. A., Gandier, S.C., 1957 Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Can J Comp Med*. 21, 47-51. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1614368/>
 11. Jiménez, C., Castillo, J, 2014. Primera preñez en una yegua obtenida en Colombia, como resultado de inseminación con semen congelado obtenido por lavado epididimal. *Referencias para Consultorio MV*. https://www.researchgate.net/publication/281272399_Primer_preñez_en_una_yegua_obtenida_en_colombiacomo_resultado_de_inseminación_con_semen_congelado_obtenido_por_lavado_epididimal
 12. Johnson, L., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Scrutchfield, W. L., 1997. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology*. 48 (7), 1199-1216. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16728209/>
 13. Brito, L., Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2007. 6 249 – 64. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1534751607000418>
 14. Hingst, O., Blottner, S., Franz, C., 1995. Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. *Andrologia* 27, 275-279. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8659706/>
 15. Hafez, E.S.E., Hafez, B., 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7 Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 509. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119265306>
 16. Arifiantini, R., Purwantara, B., Yusuf, T., Saju-thi, D., 2010. Effect of different cryoprotective agents on skim milk and dimitropoulos extender for stallion semen cryopreservation. *Journal Indonesian Trop Anim Agric*. 35, 68-74. https://www.researchgate.net/publication/228681403_Effect_Of_Different_Cryoprotective_Agents_On_Skim_Milk_And_Dimitropoulos_Extender_For_Stallion_Semen_Cryopreservation
 17. Heise, A., Kähn, W., Volkmann, D. H., Thompson, P. N., Gerber, D., 2010. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Animal reproduction science*. 118, (1) 48-53. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19592182/>
 18. Mesa, A. M., Henao, G., 2012. Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. *Revista MVZ Córdoba*. 17 (1), 2908-2915. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682012000100014&script=sci_abstract&tlng=es
 19. Morillo, A., Pessanha, T., López, M., Rocha A., Peña, F., 2012. Comparison of two freezing extenders for stallion spermatozoa: Caceres and Botucurio®. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32 (8), 499-500 https://www.researchgate.net/publication/277509151_Comparison_of_two_freezing_extenders_for_stallion_spermatozoa_Caceres_and_Botucurio
 20. Amann, R., Pickett, B., 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of equine veterinary science* .7 (3), 145-173. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080687800254>
 21. Hammerstedt, R., Graham, J., Nolan, J., 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of andrology*. 11, (1): 73-88. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2179184/>
 22. Loomis, P., Graham, J., 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*. 105 (1), 119-128. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18178040/>
 23. Scherzer, J., Fayer-Hosken, R., Aceves, M., Hurley, D., Ray, L., Jones, L., Heusner, G. L., 2009. Freezing equine semen: the effect of combinations of semen extenders and glycerol on post-thaw motility. *Austrian Veterinary Journal*. 87 (7), 275-279. https://www.researchgate.net/publication/26336669_Freezing_equine_semen_The_effect_of_combinations_of_semen_extenders_and_glycerol_on_post-thaw_motility
 24. Pommer, A., Rutlland, J., Meyers, S. A., 2002. The role of osmotic resistance on equine

- spermatozoal function. *Theriogenology*. 58 (7), 1373-1384. https://www.researchgate.net/publication/11074888_The_role_of_osmotic_resistance_on_equine_spermatozoal_function
25. Luyet, B., Hodapp, E., 1938. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Experimental Biology Medicine*. 39 3, 433-434. <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-39-10229P>
 26. Lovelock, J., 1953. Het mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta*. 11, 28-36. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0006300253900055>
 27. Morris, L., Tiplady, C., Allen, W.R., 2002. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*. 58, 643-646. https://www.researchgate.net/publication/279551970_The_in_vivo_fertility_of_cauda_epididymal_spermatozoa_in_the_horse
 28. Papa, F. O., Melo, C. M., Fioratti, E. G., Dell'Aqua Jr, J. A., Zahn, F. S., & Alvarenga, M. A. (2008). Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal reproduction science*, 107(3-4), 293-301. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432008001644>
 29. Martin, J., Klug, E., Gunzell, A., 1978. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 27, 47-51. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/289825/>
 30. Pillet, E., Batellier, F., Duchamp, G., Furstoss, V., Vern, Y., Kerboeuf, D., Vidament, M., Magistrini, M., 2008. Freezing stallion semen in INRA96®-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy Science & Technology*. 88 (2), 257-265 <https://link.springer.com/article/10.1051/dst:2008002>
 31. De Geoffroy, F. 2015. Freezing of stallion semen. *La jumeterie du Pin*. Conferencia. IFCE. https://agris.fao.org/agris-search/search.do?sessionid=DA12E94698F1A166089E70A5D63C7363?request_locale=es&recordID=BE2014110111&sourceQuery=&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=¢erString=&enableField=&agregatorField=&typesresultsField=
 32. Householder, D., Pickett, B., Voss, J., Olar, T., 1981. Effect of extender, number of spermatozoa and hCG on equine fertility. *Journal of Equine veterinary science* 1 (1), 9-13. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080681800111>
 33. Cochran, J., Amann, R., Squires, E., Pickett, B., 1983. Fertility of frozen thawed stallion semen extended in Lactose EDTA egg yolk extender and packaged in 1.0 ml straws. *Theriogenology*. 20 (6): 735-741. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X83901942>
 34. Wockener, A., Schuberth, H., 1993. Freezing of maiden stallion semen-motility and morphology findings in sperm cells assessed by various staining methods including a monoclonal antibody with reactivity against an antigen in the acrosomal ground substance. *Reproduction in domestic animals*. 28 (4), 265-272. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0531.1993.tb00995.x>
 35. Heitland, A., Jasko, D., Squires, E., Graham, J., Pickett, B., HAMILTON, C., 1996. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine veterinary journal*. 28, (1) 47-53. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8565953/>
 36. Davies, M., Mina, C., 2003. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. Cambridge, MA, USA: CABI Publishing. Web. 24 June 2015. https://www.researchgate.net/publication/37147290_Equine_reproductive_physiology_breeding_and_stud_management
 37. Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., Rouissi, H., Anel, L., 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*. 60 (7), 1249-1259. https://www.researchgate.net/publication/5804142_Effect_of_epididymis_handling_conditions_on_the_quality_of_ram_spermatozoa_recovered_post-mortem
 38. Monteiro, G. A., Papa, F. O., Zahn, F. S., Dellaqua Jr, J. A., Melo, C. M., Maziero, R. R. D., Guasti, P. N., 2011. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal reproduction science*. 127(3-4), 197-201. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21890290/>

39. Badry, D. A., Scholkamy, T. H., Anwer, A. M., Mahmoud, K. G. M., 2015. Assessment of Freezability and Functional Integrity of Dromedary Camel Spermatozoa Harvested from Caput, Corpus and Cauda Epididymides. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*. 44 (1). https://www.researchgate.net/publication/273507277_Assessment_of_Freezability_and_Functional_Integrity_of_Dromedary_Camel_Spermatozoa_Harvested_from_Caput_Corpus_and_Cauda_Epididymides
40. Murad ´as, P.R., Weiss, R.R., Kozicki, L.E., Granemann, L.C., Santos, I.W., Pimpˆao, C.T., 2006. Alguns parˆametros de viabilidade de espermatoz´oides equ´inos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epid´idimo (Some viability parameters from equine spermatozoa harvested by artificial vagina and by epididymal tail washing). *rch. Vet. Sci.* 11, 69-74 <https://www.semanticscholar.org/paper/ALGUNS-PAR%C3%82METROS-DE-VIABILIDADE-DE-ESPERMATOZ%C3%93IDES-Marad%C3%A1s-Weiss/ff4010b5a19d52f665e9b5483fbc90519c8ad-3fb>
41. Holt, W. V., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction science*, 62 (1-3), 3-22. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10924818/>
42. Olaciregui, M., Gil, L., Mont´on, A., Luno, V., Jerez, R. A., Marti, J. I., 2014. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology*, 68(1), 91-95. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224014000029>
43. Watson, P. F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*. 60, 481-492. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432000000993>
44. Castro, J. A., Chac´on, L., 2016. Aspectos generales del proceso de conservaci´on de semen equino: una revisi´on desde la congelaci´on espermática ciencias veterinarias Conexi´on Agropecuaria. 6, 45-64 <https://www.jdc.edu.co/revistas/index.php/conexagro/article/view/54>
45. Blottner, S., Warnke, C., Tuchscherer, A., Heinen, V., TormerORNER, H. 2001. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science*. 65(1), 75-88. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11182510/>
46. Muldrew, K., McGann, L. E., 1990. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophysical journal*. 57 (3), 525-532. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349590825686>
47. Quinn, P. J. (1985). A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*, 22 (2), 128-146. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3920005/>