

DOI:10.18684/BSAA(14)119-125

EFEECTO DE LA CENTRIFUGACIÓN SOBRE LA INTEGRIDAD Y LA FUNCIONALIDAD DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS

EFFECT OF CENTRIFUGATION ON INTEGRITY AND FUNCTIONALITY OF STALLION SPERMATOZOA

EFEITO DA CENTRIFUGACION NA INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES EQUINOS

GIOVANNI RESTREPO-BETANCUR¹, JESICA MARCELA CANTERO-NANCLARES²,
JUAN DAVID MONTOYA-PAEZ³

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la centrifugación sobre la integridad y la funcionalidad de espermatozoides equinos. Empleando el método de la vagina artificial se colectó el semen de diez reproductores equinos de la raza criollo colombiano, ubicados en El Valle de Aburrá (Antioquia, Colombia). Cada muestra de semen fue dividida en cuatro alícuotas, entre las cuales, tres fueron centrifugadas de forma separada a tres fuerzas de centrifugación (600 x g, 1200 x g y 1800 x g), durante 10 minutos a temperatura ambiente, mientras la cuarta no fue centrifugada (tratamiento control). Posteriormente, se evaluó la movilidad total y movilidad progresiva mediante un sistema analizador de clase (SCA®), al igual que se evaluaron el potencial de membrana mitocondrial, la vitalidad espermática y la integridad del acrosoma, mediante los ensayos fluorescentes JC1, SYBR/IP y FITC/PNA, respectivamente. Se concluye que incluso bajos niveles de fuerza de

Recibido para evaluación: 30 de Abril de 2015. **Aprobado para publicación:** 25 de Enero de 2016.

- 1 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal, Grupo de Investigación en Biotecnología Animal. Ph.D. en Biotecnología. Medellín, Colombia.
- 2 Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Biotecnología Animal. Ingeniera Agropecuaria. Medellín, Colombia.
- 3 Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Biotecnología Animal. Ingeniero Agropecuario. Medellín, Colombia.

Correspondencia: grestre0@unal.edu.co

centrifugación, logran alterar la movilidad total, la movilidad progresiva, la integridad del acrosoma y el potencial de la membrana interna mitocondrial de los espermatozoides equinos.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of centrifugation on the integrity and functionality of equine spermatozoa. Semen of ten stallion of Colombian Creole breed were collected using the artificial vagina method. The stallions were located in El Valle de Aburrá (Antioquia, Colombia). Each sperm sample was divided in four aliquots, three of them were centrifuged at one of three forces of centrifugation (600 x g, 1200 x g 1800 x g) during 10 minutes at room temperature, while the fourth was not centrifuged (control treatment). Subsequently, total motility and progressive motility were evaluated by a computer analyzer system (SCA), as well mitochondrial membrane potential, sperm viability and acrosome integrity by JC1, SYBR / PI and FITC/PNA fluorescent assays, respectively. It is concluded that even low levels of centrifugal force, can alter total motility, progressive motility, acrosome integrity and mitochondrial membrane potential of stallion spermatozoa.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da centrifugação sobre a integridade e a funcionalidade dos espermatozoides eqüinos. Usando o método da vagina artificial, o sêmen de dez eqüinos da raça crioulo colombiano, localizados no Valle de Aburrá (Antioquia, Colômbia) foram coletados. Cada amostra de sêmen foi dividida em quatro alíquotas, das quais três foram centrifugadas em uma das três forças de centrifugação (600 xg, 1200x g 1800 xg) durante 10 minutos a temperatura ambiente, enquanto a quarta não foi centrifugada (tratamento controle). Posteriormente, a mobilidade total e a motilidade progressiva foram avaliadas por un sistema de análise computarizado (SCA), assim como o potencial de membrana mitocondrial, a viabilidade espermática e a integridade do acrossoma foram avaliados por meio das provas fluorescentes JC1, SYBR/IP e FITC/PNA, respectivamente. Conclui-se que mesmo níveis baixos de força centrífuga, podem alterar a mobilidade total, a motilidade progressiva, a integridade do acrosoma e o potencial da membrana interna mitocondrial dos espermatozoides eqüinos.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una tecnología reproductiva de crítica importancia en la producción animal [1]. En equinos, este proceso biotecnológico permite el progreso genético, siendo fundamental contar con semen de buena calidad, para la obtención de embriones viables y gestaciones a término. La integridad y por ende la funcionalidad de estructuras del espermatozoide, como el núcleo, el citoplasma, el acrosoma y las mitocondrias, son susceptibles a diversas alteraciones derivadas de los procesos de

PALABRAS CLAVE:

Semen, Movilidad Espermática, Mitocondria, Acrosoma, Vitalidad.

KEYWORDS:

Semen, Spermatic Motility, Mitochondria, Acrosome, Vitality.

PALABRAS-CHAVE:

Sêmen, Mobilidade Espermática, Mitocôndria, Vitalidade, Acrossoma.

criopreservación [2]. La centrifugación es un proceso utilizado durante el tratamiento del semen, para su almacenamiento en refrigeración y congelación [3,4]. De igual forma, se utiliza dada la necesidad de aumentar la concentración de los espermatozoides, para la inseminación artificial de las yeguas [5,6].

Posiblemente, el principal uso de la centrifugación en el procesamiento del semen equino, radica en la necesidad de retirar el plasma seminal, considerado perjudicial sobre la capacitación de los espermatozoides [7]. Se conoce que la refrigeración del semen de algunos caballos, en presencia de plasma seminal, resulta en menor calidad y vitalidad espermática [8]. De tal forma, que la centrifugación del semen equino se ha convertido cada vez más, en un procedimiento común en la industria equina dedicada a la cría [9]. No obstante, la centrifugación es uno de los procesos que afecta la viabilidad de los espermatozoides [10], generando alteraciones de diversa índole sobre éstos [11]. Un aumento en el tiempo de centrifugación o en la fuerza gravitacional, puede disminuir la movilidad de los espermatozoides e incluso su calidad en general, debido a las fuerzas mecánicas asociadas [12].

En las últimas dos décadas, se han desarrollado técnicas de evaluación seminal, basadas en métodos fluorescentes, que permiten una valoración más precisa de la integridad de diversos compartimentos y estructuras celulares como las mitocondrias, el ADN nuclear y la membrana plasmática y acrosomal [12], así como han permitido evaluar diferentes aspectos de la capacidad funcional de las células espermáticas [13, 14]. A diferencia de los métodos convencionales de evaluación seminal, las técnicas recientes permiten reconocer de manera más precisa, las alteraciones celulares ocasionadas por procedimientos como la centrifugación, haciendo más factible, realizar los ajustes necesarios en los procesos de separación espermática. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes fuerzas de centrifugación sobre algunos aspectos relacionados con la integridad y la funcionalidad de los espermatozoides equinos.

MÉTODO

Localización

El material de investigación se recolectó en las zonas norte y sur del Valle de Aburrá, en el Departamento

de Antioquia. Las muestras se procesaron y evaluaron en el laboratorio de Biotecnología animal del Centro de experimentación y laboratorios del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid ubicado en el municipio de Bello.

Obtención del material de investigación

Diez ejemplares equinos (*Equus caballus*) de la raza criollo colombiano, se utilizaron para la recolección de un eyaculado por animal. Los animales estuvieron sujetos a condiciones similares de alimentación, ambiente y manejo reproductivo. La condición corporal de los equinos estuvo entre 4 y 6 (escala 1-9). La colección del semen se realizó mediante el método de la vagina artificial, en una vagina modelo Missouri, lubricada con gel no espermicida. Se utilizó una yegua con la finalidad de aumentar la estimulación sexual. La fracción en gel del eyaculado se removió con un filtro estéril. El semen recién colectado se diluyó en proporción 1:1 en diluyente EquiPlus® (Minitube, Tiefenbach, Alemania), el cual se precalentó a 37°C. Posteriormente, el semen se transportó hacia el laboratorio en condiciones de refrigeración (5°C), dentro de las tres horas posteriores a la colecta.

Tratamientos de centrifugación seminal

Se evaluaron tres (3) fuerzas de centrifugación seminal, de la siguiente manera: 600 x g, 1200 x g y 1800 x g. El tiempo de centrifugación para todos los tratamientos fue de 10 minutos. Adicionalmente, se incluyó un (1) tratamiento control con semen no centrifugado. Posterior a la centrifugación, el precipitado de espermatozoides se rediluyó en medio EquiPlus®, en cantidad suficiente para una concentración de 100 x 10⁶ espermatozoides/mL.

Evaluación seminal

Movilidad espermática. La movilidad de los espermatozoides se evaluó mediante un sistema de análisis computarizado. Se utilizó un microscopio de contraste de fase Eclipse E200 (Nikon Inc., Mellville, USA), con una cámara digital Scout SCA780 (Basler, Ahrensburg, Alemania), adaptada a un computador dotado del software SCA® (Microptic S.L, Barcelona, España). Dentro del estudio se incluyeron los parámetros de movilidad total (MT) y movilidad progresiva (MP).

Vitalidad. La vitalidad de los espermatozoides (VE), se evaluó mediante un procedimiento previamente

descrito [14], utilizando el kit Live/Dead® Sperm Viability (Molecular Probes, Oregon, USA). Se preparó una suspensión de células (20×10^6 espermatozoides / mL), en solución Hanks Heppes (HH), suplementada con 1% de albúmina sérica bovina (BSA). Dicha suspensión se incubó con 6 mM de SYBR14, durante 8 minutos a 37°C. Y luego, se incubó con 0,48 mM de yoduro de propidio (PI), bajo las mismas condiciones. Muestras de 5 μ L de la suspensión, se evaluaron mediante el conteo de 200 espermatozoides, en un microscopio E200 con fluorescencia HBO (Nikon Inc., Mellville, USA).

Potencial de membrana mitocondrial. La evaluación del potencial de la membrana interna mitocondrial (PM) de los espermatozoides, se realizó mediante la sonda JC-1 (Molecular Probes, Oregon, USA), de acuerdo con un protocolo previamente descrito [13]. Semen diluido a una concentración de 20×10^6 espermatozoides / mL, se incubó con 2mM de JC-1 en dimetilsulfóxido (DMSO), durante 8 minutos a 37°C. Las lecturas se realizaron mediante un microscopio E200 con fluorescencia HBO (Nikon Inc., Mellville, USA). A partir del conteo de 200 espermatozoides, se calculó el porcentaje de espermatozoides con patrones de fluorescencia roja, correspondientes a altos niveles de potencial de membrana mitocondrial.

Integridad acrosómica de los espermatozoides. El estado de integridad acrosomal de los espermatozoides (IA), se evaluó mediante la metodología FITC-PSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), de acuerdo a reportes previos [15]. Se realizaron extendidos de semen, los cuales se fijaron con etanol al 95% y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, se tiñeron con 25 μ L de una solución de FITC-

PSA, preparada en solución buffer fosfato (PBA) a una concentración de 1 mg/mL. Posteriormente, los extendidos se dejaron secar por 30 minutos, a temperatura ambiente y en la oscuridad. Se realizó el conteo de 200 espermatozoides por muestra, mediante con un microscopio E200 con fluorescencia HBO (Nikon Inc., Mellville, USA). Se consideraron como espermatozoides con la pieza acrosómica íntegra, aquellos en los que se observó el acrosoma completo.

Análisis estadístico

Para la evaluación estadística se realizó un diseño completamente al azar. Los resultados fueron analizados mediante el ajuste de un modelo lineal generalizado (GLM), para cada uno de los parámetros de calidad seminal (variables dependientes). Se incluyeron como covariables de calidad seminal, aquellos parámetros que presentaron correlaciones significativas con la variable dependiente, después de un análisis de correlación de Pearson. Las medias para cada tratamiento (fuerza de centrifugación), se compararon por la prueba de Tukey (HSD).

El modelo general ajustado fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + E_i + T_j + C_k + e_{ijkl} \text{ donde:}$$

Y_{ijkl} : es la variable dependiente, que puede ser MT, MP, VE, PM ó IA.

μ : Media para la característica.

E_i : Efecto fijo del equino (i). ($i=1-10$).

T_j : Efecto fijo del tratamiento (j). (1-4).

C_k : Efecto fijo de la(s) covariable(s) de calidad seminal (k)

e_{ijkl} : Error residual.

Cuadro 1. Resultados para los modelos ajustados.

Variable	Media \pm DE (%)	CV (%)	Max (%)	Min(%)	R ²	ES
MT	63,3 \pm 26,5	41,9	96,1	7,1	0,9	E, T, MP
MP	41,8 \pm 21,6	51,8	74,5	2,3	0,9	E, T, MT
PMM	54,1 \pm 14,5	26,8	86	20	0,8	E, T
VE	48,8 \pm 13,2	27,1	78	20	0,8	E, T
IA	67,8 \pm 14,9	22,1	96	40	0,8	E,T

Coefficiente de variación (CV), Coeficiente de determinación (R²), efectos significativos ($P \leq 0,05$) para el modelo (ES), movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), potencial de membrana mitocondrial (PMM), vitalidad espermática (VE), integridad acrosómica (IA), equino (E), tratamiento (T)

RESULTADOS

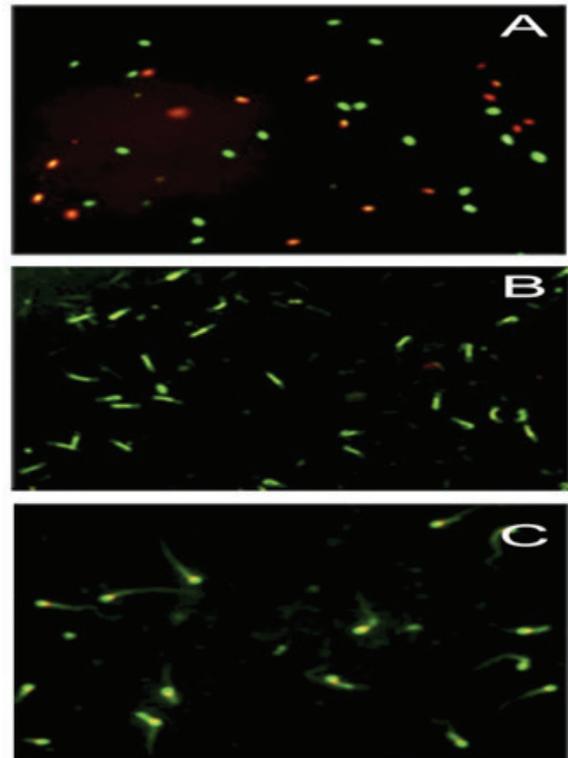
Un total de 10 eyaculados provenientes del mismo número de equinos, fueron evaluados bajo los diferentes tratamientos. El Cuadro 1, muestra los resultados de los modelos estadísticos ajustados, para cada uno de los parámetros de calidad seminal (variables dependientes).

En cada uno de los modelos estadísticos, las variables de calidad seminal fueron explicadas en una alta proporción por los efectos incluidos ($R^2 \geq 0,8$), siendo en todos los casos significativos, los efectos del equino y el tratamiento de centrifugación. En otras investigaciones se ha encontrado que una amplia proporción de la variabilidad en parámetros como la movilidad progresiva, la vitalidad y la integridad de membrana, es debida a los efectos del reproductor y del eyaculado [16]. Las medias encontradas para los parámetros de calidad seminal (Cuadro 2), del semen fresco no centrifugado (control), son similares a algunas reportadas en la literatura [9].

Se observó un efecto perjudicial de la centrifugación, sobre los diferentes parámetros de integridad y funcionalidad espermática (cuadro 2), los cuales fueron inferiores ($P \leq 0,05$) para todos los tratamientos (fuerzas de centrifugación), respecto al semen no centrifugado (control). Como excepción, para la VE solo se observó una reducción significativa cuando se centrifugó a 1800 x g. Entre todos los demás tratamientos (600 x g, 1200 x g, 1800 x g), no se encontró diferencia estadística ($P \leq 0,05$) para MT, MP, PMM e IA. La figura 1 muestra ejemplos de las pruebas fluorescentes de VE, PMM e IA.

En concordancia con los resultados encontrados en este trabajo, diferentes investigadores reportan que

Figura 1. Pruebas fluorescentes de evaluación seminal.



A: Prueba de vitalidad espermática (SYBR/PI), fluorescencia en núcleo. B: Prueba de potencial de membrana mitocondrial (JC1), fluorescencia en pieza media. C: Prueba de integridad acrosómica (FITC-PNA), fluorescencia en acrosoma intacto.

la centrifugación, genera daños mecánicos sobre los espermatozoides equinos, los cuales dependen de la duración y la fuerza con que sea ejecutada [6]. Se observó que incluso la menor fuerza de centrifugación evaluada (600 x g), produjo una reducción en la integridad y funcionalidad espermática. Sin embargo,

Cuadro 2. Resultados de la comparación de medias.

Tratamiento	MT (%)	MP (%)	PMM (%)	VE (%)	IA (%)
Control	76,7 ± 20,6 ^a	50,4 ± 20,3 ^a	62,7 ± 10,9 ^a	54,4 ± 13,6 ^a	75,5 ± 14,1 ^a
600 g	57,2 ± 27,6 ^b	39,2 ± 22,7 ^b	53 ± 12,7 ^b	48,1 ± 8,7 ^a	66,80 ± 15,2 ^b
1200 g	61,6 ± 27,6 ^b	40,6 ± 23,2 ^b	51,9 ± 15,7 ^b	47 ± 14,5 ^a	66 ± 14,8 ^b
1800 g	54,5 ± 29,4 ^b	34,9 ± 21,4 ^b	48,8 ± 16,3 ^b	45,9 ± 15,5 ^b	63 ± 15,1 ^b

Los resultados son expresados como Media ± Desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencia estadística ($P \leq 0,05$). Movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), potencial de actividad mitocondrial (PMM), vitalidad espermática (VE), integridad acrosómica (IA).

para la VE podría considerarse que la centrifugación comienza a constituirse en un factor deletéreo a fuerzas cercanas a 1800 x g.

En otro estudio, se observó que la menor pérdida de células espermáticas, por daños asociados a la centrifugación, se presentó a 600 x g durante 10 minutos [4]. Otras investigaciones que involucraron iguales condiciones de centrifugación seminal, presentaron valores de MT y MP, similares o incluso menores a los obtenidos en este trabajo [4, 17]. En semen centrifugado a 1000 x g durante 20 minutos, se observó una reducción en los porcentajes de movilidad y en la velocidad del movimiento [17], mientras los niveles de integridad acrosómica bajo estas mismas condiciones, serían equivalentes a las alcanzadas después de 48 horas de refrigeración [18].

De forma general, puede considerarse que un alta fuerza de centrifugación, es perjudicial para la integridad de los espermatozoides [19]. Más aún cuando estudios donde se han evaluado bajas fuerzas de centrifugación (300 x g y 400 x g), han permitido mantener niveles de vitalidad espermática, superiores al 75% [3, 20]. Sin embargo, algunos estudios indican que el aumento de la fuerza hasta 1800 x g o 2400 x g, durante un período corto de tiempo (5 min.), es necesaria para reducir considerablemente la pérdida de espermatozoides en el sobrenadante después de la centrifugación [21].

Trabajos donde se han utilizado diferentes fuerzas de centrifugación, buscando una máxima recuperación celular, han demostrado que los incrementos en dicha fuerza, pueden conducir a pérdidas entre el 15% y el 20% de los espermatozoides [22]. De acuerdo a lo anterior, es importante continuar evaluando alternativas de centrifugación que conduzcan a una máxima recuperación celular, condicionada a la menor reducción posible en la integridad y la funcionalidad de los espermatozoides equinos.

CONCLUSIONES

El uso biotecnológico del semen equino involucra la manipulación excesiva y el sometimiento de los espermatozoides a condiciones estresantes. Se conoce que la centrifugación es intrínsecamente nociva, y puede generar alteraciones celulares. La disponibilidad de métodos de evaluación seminal por sistemas computarizados y fluorescencia, permiten valorar de

una forma más precisa el impacto de la centrifugación sobre la integridad y la funcionalidad de las células espermáticas.

De este estudio se concluye que incluso bajos niveles de fuerza de centrifugación, logran alterar la movilidad espermática, la integridad del acrosoma y el potencial de la membrana interna mitocondrial de los espermatozoides equinos; mientras la vitalidad espermática como indicador asociado con la funcionalidad de la membrana plasmática, parecería indicar una mayor tolerancia de esta estructura al estrés originado por la centrifugación en niveles inferiores a los 1800 x g. La información derivada de este estudio podría constituirse en un insumo importante para el ajuste e implementación de nuevos esquemas de separación de espermatozoides equinos.

REFERENCIAS

- [1] HANSEN, P. Current and future reproductive technologies and world food production. *Advances in experimental medicine and biology*, 752, 2014, p. 1-22.
- [2] NOURI, H., ARMIN, T., ZHANDI, M.Z. and SADEGUI, R. The Effects of Centrifuged Egg Yolk Used with INRA Plus Soybean Lecithin Extender on Semen Quality to Freeze Miniature Caspian Horse Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33, 2013, p. 1050-1053.
- [3] FERRER, M.S., LYLE, S.K., EILTS, B.E., ELJARRAH, A.H. and PACCAMONTI, D.L. Factors affecting sperm recovery rates and survival after centrifugation of equine semen. *Theriogenology*, 78, 2012, p. 1814-1823.
- [4] ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., MARCIO, T., KIEVITSBOSCH, T., MANOELA, M.B., CASTRO, C. and RAMIRES, N. Methods of Concentrating Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32, 2012, p.424-429.
- [5] BLISS, S.B., VOGEL, J.L., HAYDEN, S.S., TEAGUE, S.R., BRINSKO, S.P., LOVE, C.C., BLANCHARD, T.L. and VARNER, D.D. The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *Theriogenology*, 77, 2012, p. 1232-1239.
- [6] RAMIRES-NETO, C., MONTEIRO, G.A., SOARES, R.F., PEDRAZZI, C., DELL'AQUA, J.R., PAPA, F.O., CASTRO-CHAVEZ, M.M. and ALVARENGA, M.A. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*, 79, 2013, p. 1120-1123.

- [7] GUASTI, P.N., SOUZA, F.F., SCOTT, C., HARTWIG, F.P., PAPA, M.P., DOS SANTOS, G.A.M., FREITAS-DELLAQUA, C.P. and PAPA F.O. Protein content of equine seminal plasma and sperm plasma membrane in subfertile stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34, 2014, p. 84-85.
- [8] RAMIRES-NETO, C., MONTEIRO, G.A., FATIMASOARES, R., CESAR PEDRAZZI, R., DELL'AQUA, J.A., PAPA, F.O. and ALVARENGA, M.A. Effect of removing seminal plasma using a sperm filter on the viability of refrigerated stallion semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33, 2013, p. 40-43.
- [9] SABATINI, C., PERRIN, A., VARNER, D., BLANCHARD, T., ROTA, A. and LOVE, C. Effect of density gradient centrifugation with three different media on stallion semen quality. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(1), 2014, p. 77.
- [10] MORREL, J.M., WINBLAD, C., GEORGAKAS, A., STUHTMANN, G., HUMBLOT, P. and JOHANNISSON, A. Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. *Animal reproduction science*, 140, 2013, p. 62-69.
- [11] NEIRA, J.A., RAMIREZ, G.F., LEON-GARCIA, S.A. and MORENO-GARCIA, D.A. Efecto de la asociación de la L-Glutamina- Etilenglicol en criopreservación de semen equino. *Revista de Medicina Veterinaria*, 14, 2007, p. 93-105.
- [12] RESTREPO, G., USUGA, A. y ROJANO, B. Técnicas de evaluación para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. *Revista CES Medicina Veterinaria Zootecnia*, 8(1), 2013, p. 69-79.
- [13] LOVE, C., THOMPSON, J., BRINSKO, S., RIGBY, S., BLANCHARD, T., LOWRY, V.K. and VARNER, D.D. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology*, 60(6), 2003, p. 1127-1138.
- [14] GAMBOA, S., RODRIGUES, A., HENRIQUES, I., BATISTA, C. and RAMALHO-SANTOS, J. Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 73(7), 2010, p. 950-958.
- [15] GIBB, Z., BUTLER, T.J., MORRIS, L.H.A., MAXWELL, W.M.C. and GRUPEN, C.G., Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. *Theriogenology*, 79, 2013. p. 1001-1009.
- [16] RESTREPO, G., USUGA, A., MONTROYA, J.D., CELIS, A.D. y HENAO, A.A. Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista La-sallista de investigación*, 11(2), 2014, p. 63-70.
- [17] GARY, W. and DEAD, M.M. Effect of centrifugation technique on post-storage characteristics of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29 (9), 2009, p. 675-680.
- [18] LOVE, C.C., BLANCHARD, T.L., VARNER, D.D., BRINSKO, S.P., VOGEL, J., BLISS, S., SUDDERTH, S., TEAGUE, K. and LACAZE, K. Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality following cooled storage. *Theriogenology*, 77, 2012, p. 1911-1917.
- [19] MARI, G., BUCCI, D., LOVE, C.C., MISLEI, B., RIZZATO, G., GIARETTA, E., MERLO, B. and SPINACI, M. Effect of cushioned or single layer semen centrifugation before sex sorting on frozen stallion semen quality. *Theriogenology*, 83, 2015, p. 953-958.
- [20] GUTIERREZ-CEPEDA, L., FERNANDEZ, A., CRESPO, F., GOSALVEZ, J. and SERRES, C. Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. *Animal reproduction Science*, 124, 2011, p. 85-89.
- [21] COCCHIA, N., PASOLINIA, M., MANCINIB, R., PETRAZZUOLO, O., CRISTOFAROD, I. and ROSAPANE, I. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 75(1), 2011, p. 1201-1210.
- [22] ALVARENGA, M.C., PAPA, F.O., CARMO, T.M., KIEVITSBOSCH, T., CASTRO, M.M. and RAMIREZ, C. Methods of concentrating stallion semen. *Journal of equine veterinary science*, 32, 2012, p. 424-429.