

# Evaluación del efecto de la refrigeración Sobre la calidad del semen equino

## *Evaluation of the effect of the refrigeration on the quality of the equine semen*

Natalia Giraldo S.<sup>1</sup>, Juan Esteban Correa Villegas<sup>2</sup>, Neil Vásquez Araque<sup>3</sup>

### Resumen

---

Con el fin de determinar el momento óptimo en el que el semen equino refrigerado puede ser usado para tener mayores probabilidades de preñez, se realizaron pruebas para conocer el efecto que el proceso de refrigeración puede tener sobre la funcionalidad de membrana espermática, la movilidad y viabilidad. Para este trabajo se seleccionaron cinco equinos, que fueron colectados una vez por semana, durante tres semanas. Cada muestra se evaluó en diferentes momentos, así: semen fresco, a las 24 y a las 48 horas de refrigeración evaluando, así, la viabilidad, la movilidad y Test Hiposmótico.

Se encontró que el semen se puede refrigerar por 24 horas sin tener mayores alteraciones o cambios en sus parámetros, debido a la acción del diluyente sobre los espermatozoides. Sin embargo, no es muy recomendable almacenar semen por tiempos prolongados para la inseminación ya que las características que hacen funcional al espermatozoide disminuyen drásticamente a las 48 horas de refrigeración.

### Abstract

---

With the purpose of determining the ideal moment in which refrigerated equine semen can be used to guarantee higher probabilities of pregnancy, different tests were taken in order to evaluate the consequences of the process of refrigeration on the functionality of spermatic membrane, the mobility and viability of the semen. Five horses were chosen to be evaluated. All of them were collected once a week, for three weeks. Every sample taken was evaluated in three different moments: fresh semen, 24-hour-refrigerated semen and 48-hour-refrigerated semen.

It is possible to conclude that equine semen can be refrigerated for 24 hours without having major alterations or changes in its parameters, due to the action the extender has on sperms. Nevertheless, it is not very advisable to store semen for long periods of time before the insemination since the characteristics that make it functional diminish drastically after 48 hours of refrigeration.

---

<sup>1</sup> Zootecnista. Universidad Nacional. [natygi@hotmail.com](mailto:natygi@hotmail.com), / tel: (57) (4) 2-16-04-24

<sup>2</sup> MVZ. Correspondencia: [jcorreavillegas@hotmail.com](mailto:jcorreavillegas@hotmail.com), / tel: (57) (4) 4-44-05-55 ext. 367.

<sup>3</sup> BiólogoMSc. Grupo de biotecnología animal, Facultad de Ciencias – Universidad Nacional de Colombia Seccional Medellín.

## Key Words

## Introducción

Con la implementación de la inseminación artificial y otras técnicas de reproducción asistida, el almacenamiento de espermatozoides se ha convertido en un procedimiento de gran importancia para la obtención de embriones y las técnicas de fertilización *in vitro*.

La aceptación del semen congelado por importantes asociaciones equinas como la Asociación de Caballos Árabes, Asociación de Caballos Cuarto de Milla y Asociación de Caballos Pinto Americano, han estimulado la investigación de protocolos para criopreservar semen equino.

Sin embargo, se ha estimado que sólo 30-40% de los caballos producen semen apto para la criopreservación y se ha observado una consistente variación de la congelación de espermatozoides entre criaderos<sup>(1)</sup>, lo cual ha dificultado la amplia aplicación del uso del semen congelado y refrigerado por la industria equina. Se prevé que la industria equina utilizará semen refrigerado y congelado en una amplia escala sólo cuando la fertilidad del mismo sea mejorada y demostrada<sup>(2)</sup>.

Para evaluar la resistencia del semen equino a estos cambios de temperatura se han incluido diferentes parámetros tales como la movilidad, viabilidad y morfología, entre otros. Pero éstos son deficientes en suministrar valores predictivos de funcionalidad del semen para la fertilidad. Debido a esto, se han diseñado metodologías que permitan una evaluación más funcional y ágil que complementen los

parámetros espermáticos utilizados en nuestro medio.

A pesar del esfuerzo de muchos investigadores por mejorar las técnicas de refrigeración equina, la pérdida de viabilidad en el espermatozoide equino después de la refrigeración continúa siendo limitante para el amplio uso de la técnica. Uno de los tipos de daño frecuentemente encontrado en semen descongelado es la pérdida en la integridad de membrana directamente en su supervivencia y en su capacidad fertilizante<sup>(1,3)</sup>.

Los métodos a los que son sometidos los espermatozoides como el lavado, centrifugación, refrigeración y congelación pueden generar, directa o indirectamente, daños irreversibles al espermatozoide, los cuales pueden disminuir su funcionalidad<sup>(7,10,19)</sup>. Sin embargo, se ha encontrado que la capacidad de un animal para que su semen sea sometido a procesos como la refrigeración y criopreservación, está determinada genéticamente<sup>(22)</sup> idealmente en equinos donde encontramos unas grandes falencias para manipular este tipo de muestras por el impacto que tienen estos procedimientos sobre la fertilidad del mismo, lo cual hace necesario la implementación de pruebas que permitan determinar la fertilidad del semen y seleccionar los mejores ejemplares para dichos procedimientos. Además, se ha reportado que las centrifugaciones y la criopreservación inducen una liberación significativa de especies reactivas de oxígeno (ERO) que afectan la estabilidad de la membrana, la integridad de los receptores de membrana y el DNA nuclear en el espermatozoide<sup>(4)</sup>, resultando en una disfunción

espermática que puede traer efectos negativos en la unión oocito – espermia <sup>(13)</sup>.

Como se mencionó anteriormente con todos estos procesos queda comprometida de manera irreversible la membrana del espermatozoide por lo cual se hace necesario evaluar la funcionalidad de la membrana de los espermatozoides expuestos a diluyentes y a la refrigeración. Debido a esto se han diseñado metodologías que permitan una evaluación más funcional y ágil que complementen los parámetros espermáticos utilizados en nuestro medio. Una de estas técnicas es el Test Hiposmótico (HOST), el cual permite evaluar la funcionalidad de la membrana espermática, al sufrir un hinchamiento, después de ser sometido a una solución hiposmótica. Según Devireddy y colaboradores <sup>(10)</sup> la valoración de la integridad de la membrana puede ser un indicador de la capacidad fertilizante del espermatozoide.

Los parámetros estandarizados usados para evaluar la infertilidad del macho (número total de espermatozoides, movilidad progresiva, morfología) tienen una capacidad limitada para predecir el potencial de un eyaculado <sup>(15)</sup>. La membrana espermática es de fundamental importancia en el proceso de fertilización, por esta razón se ha dedicado bastante atención a esta área de estudio en los últimos años. Tres tests están disponibles para evaluar la integridad de membrana, entre ellos encontramos las tinciones supravitales, TBA (tiobarbituric acid assay) y Test Hiposmótico.

Cuando son expuestos a una solución hiposmótica, los espermatozoides funcionales se hincharán para establecer un equilibrio osmótico, produciendo un típico hinchamiento en la cola, ya que la fertilización no ocurre si la membrana espermática está bioquímicamente inactiva, inclusive si el espermatozoide está estructuralmente intacto.

El Test Hiposmótico es un indicador más apropiado que la tinción supravital <sup>(18)</sup>.

Por esta razón se pretende evaluar, la movilidad, la viabilidad y la funcionalidad de la membrana espermática para observar el efecto de varios tiempos de refrigeración sobre la calidad del semen equino e introducir al test hiposmótico como

parámetro funcional de la capacidad fertilizante del espermatozoide, incluyendo este procedimiento en las evaluaciones de rutina del semen equino.

## Materiales y Métodos

El experimento se realizó con semen de cinco equinos Criollos Colombianos del criadero Santa Rita, ubicado en el municipio de La Estrella en el Valle de Aburrá. Los equinos estudiados están entre los 4 y 8 años de edad. Cada uno fue colectado una vez por semana durante un periodo de tres semanas. Las muestras de eyaculado de cada caballo se tomaron por medio de una vagina artificial tipo Hannoveriana a una temperatura de 55°C, lubricada previamente y protegida hasta el momento del eyaculado. Posteriormente fueron transportadas a 37°C hasta el laboratorio de Medicina Tropical del CES el cual se encuentra a 10 minutos del criadero.

Al llegar, cada muestra de semen se dividió en tres partes iguales a las cuales se les adicionó previamente el diluyente Kenney en una relación 3:1 <sup>(23)</sup> para ser sometidos a la refrigeración. El primer grupo fue sometido a refrigeración a 5°C durante 24 horas, el segundo grupo fue refrigerado a 5°C por 48 horas, y el tercer grupo fue evaluado inmediatamente sin refrigeración estableciendo los siguientes parámetros: concentración, volumen, movilidad, viabilidad, morfología y funcionalidad de membrana. Después de cada tiempo de refrigeración, a cada muestra se le determinó la viabilidad y la funcionalidad de membrana espermática (HOST).

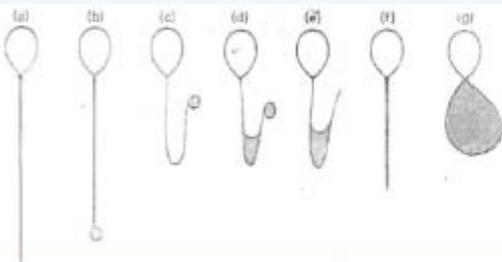
La concentración fue determinada por medio del recuento en cámara Neubauer con ayuda de un microscopio de luz (NIKON) con un aumento de 1000X. La movilidad se evaluó haciendo una dilución 10 en 200 de la siguiente manera: movilidad progresiva, movilidad no progresiva e inmóviles <sup>(20)</sup>. La morfología y viabilidad se determinaron usando la tinción vital eosina/nigrosina <sup>(11)</sup>. La funcionalidad de la membrana espermática se determinó con el uso de la técnica Test Hiposmótico (HOST).

## Determinación de la funcionalidad de membrana (host):

En un vial, se adiciona 1 ml de la solución hiposmótica [100 mOsmol/L] compuesta por fructosa y citrato de sodio preparado en agua grado reactivo, y se mezcla con 0.1ml del botón que se obtiene del lavado los espermatozoides. Esta solución (mezcla) fue incubada a 37°C por un periodo de media hora<sup>(13)</sup>.

Para medir hinchamiento espermático, se colocó una gota de la mezcla sobre un portaobjetos y se tapó con un cubreobjetos para observar bajo microscopio de contraste de fase a 400X. Se contaron 200 espermatozoides en, al menos, 5 campos diferentes. La proporción total y los diferentes patrones de hinchamiento se calcularon dividiendo el número de células reaccionadas por 100 sobre el total de espermatozoides contados en la misma área. Los espermatozoides reaccionados se observan como se muestra en la figura 1.

**Figura 1.** Tipos de espermatozoides. *a.* Espermatozoide no reaccionado por el Test Hiposmótico. *b-g.* Espermatozoides reaccionados por el Test Hiposmótico, con buena funcionalidad de membrana.



Los tratamientos estudiados fueron: T1 semen fresco, T2 semen refrigerado por 24 horas, T3 semen refrigerado por 48 horas.

## Análisis estadístico

Los resultados se evaluaron mediante un diseño experimental de bloques al azar donde cada parámetro espermático evaluado fue un bloque. Se calcularon los porcentajes de test hiposmótico, viabilidad y movilidad después de ser sometidos a los tres tratamientos. Estos datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANAVA) utilizando el programa SAS System Program versión 4. El análisis de comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey.

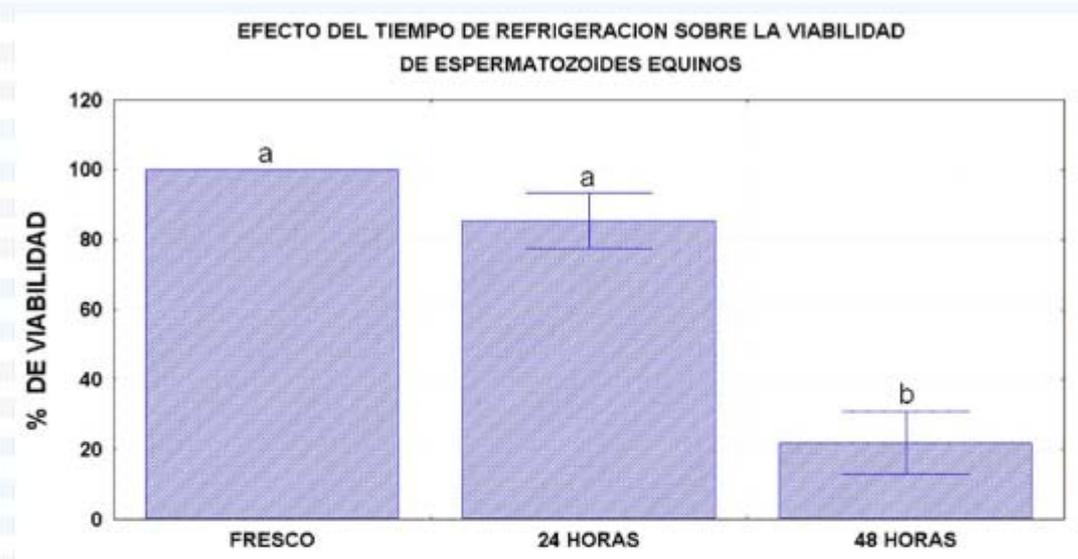
## Resultados y Discusión

Para los análisis estadísticos, los datos obtenidos fueron transformados en porcentaje con respecto al obtenido en fresco (inicial). Los análisis de varianza que se realizaron para cada parámetro espermático en los diferentes tiempos de refrigeración presentaron diferencias altamente significativas.

Al evaluar la viabilidad se encontró un promedio de  $57 \pm 6.4\%$  en el semen fresco ( $n= 5$  caballos), similar al reportado por Parlevliet<sup>(16)</sup> ( $65 \pm 16\%$ ). Este parámetro disminuyó con el tiempo de refrigeración ( $p<0.0001$ ), siendo de  $50.2 \pm 8.8\%$  a las 24 horas y de  $30.4 \pm 12\%$  a las 48 horas. Al realizar la comparación de medias (Test de Tuckey) (Anexo 1), con respecto al porcentaje de viabilidad inicial, a las 24 horas de refrigeración la viabilidad bajó a un 14.59%, sin presentar diferencia significativa ( $p>0.05$ ), mientras que a las 48 horas se presenta una disminución del 78.2% encontrando un efecto negativo de la refrigeración sobre la viabilidad ( $p<0.001$ ).

Este efecto también se observó cuando se compararon los tratamientos 24 vs. 48 horas de refrigeración, encontrando una disminución del 63.61% a las 48 horas (Tabla 1), siendo altamente significativa ( $p<0.001$ ) (Figura 2).

**Figura 2.** Efecto del tiempo de refrigeración sobre la viabilidad de espermatozoides. Los espermatozoides fueron refrigerados durante 24 y 48 horas. Los datos son presentados como porcentaje promedio con respecto al control (Fresco)  $\pm$  Error Estándar.  $n=5$  machos, y tres repeticiones de cada animal. Letras diferentes presentan diferencia estadística ( $p<0.001$ ).

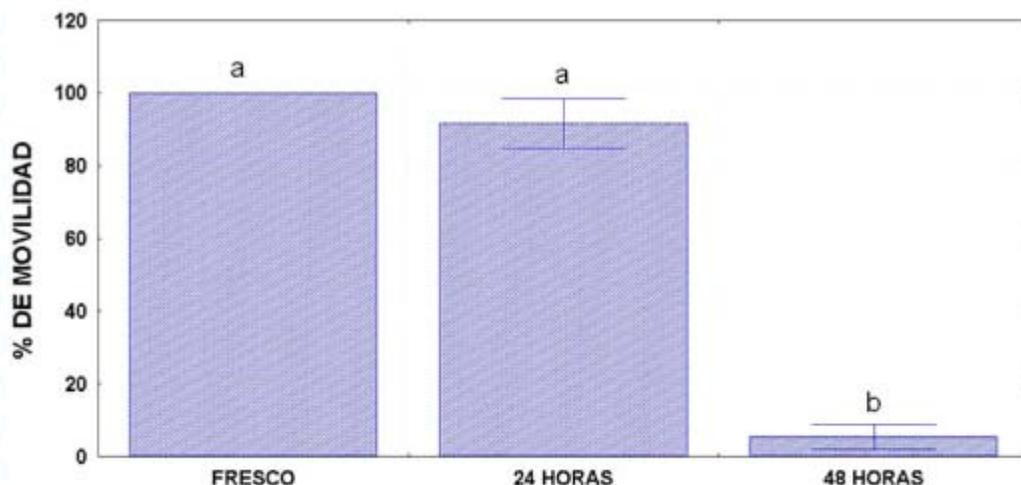


Otro parámetro evaluado fue la movilidad, en la cual se encontró un promedio de  $37.6 \pm 12\%$  en el semen fresco ( $n=5$  caballos), porcentaje menor que el reportado para semen equino fresco por Pickett <sup>(17)</sup> ( $53 \pm 15\%$ ). Este parámetro fue afectado por el tiempo de refrigeración ( $p<0.0001$ ), siendo de  $38.6 \pm 9.6\%$  a las 24 horas y de  $3.2 \pm 1.3\%$  a las 48 horas. En la prueba de comparación de medias (Tuckey) (Anexo 2) se encontró, con respecto al porcentaje de movilidad inicial, que a las 24 horas de refrigeración la movilidad baja un 8.3%, sin embargo esta diferencia no es significativa ( $p>0.05$ ), mientras que a las 48 horas disminuye significativamente en un 94.6% ( $p<0.001$ ). Al comparar los tratamientos 24 horas vs. 48 horas de refrigeración se presenta una disminución del 86.30% a las 48 horas ( $p<0.001$ ) (ver tabla 1 y figura 3).

**Figura 3.** Efecto del tiempo de refrigeración sobre la movilidad de espermatozoides. Los espermatozoides fueron refrigerados durante 24 y 48 horas. Los datos son presentados como porcentaje promedio con respecto al control (Fresco)  $\pm$  Error Estándar.  $n=5$  machos, y tres repeticiones de cada animal. Letras diferentes presentan diferencia estadística ( $p<0.001$ ).

(Ver Página Siguiente)

**EFFECTO DEL TIEMPO DE REFRIGERACION SOBRE LA MOVILIDAD  
DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS**



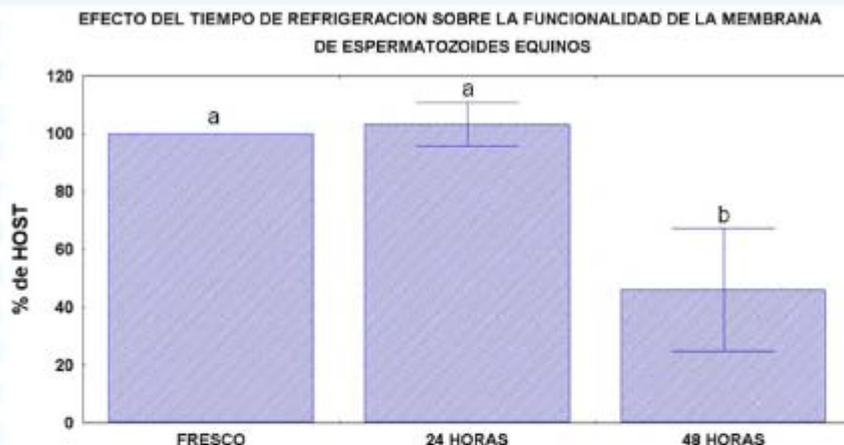
El porcentaje de espermatozoides reaccionados en el Test Hiposmótico (HOST) presenta una diferencia significativa ( $p=0.0146$ ) (Anexo 3). El HOST en fresco fue de un  $32.7 \pm 5.9\%$ , mientras que el porcentaje de HOST reportado para equinos fresco es de  $47.5 \pm 12.4\%$ . A las 24 horas de refrigeración fue de  $34.7 \pm 7.8\%$ , mientras que a las 48 horas fue de  $14.36 \pm 13.5\%$ .

Este parámetro presenta un leve incremento a las 24 horas de refrigeración (3.2%) respecto al inicial, sin embargo esta diferencia no es significativa cuando se realiza la prueba de comparación de medias de Tuckey ( $p>0.05$ ). A las 48 horas presenta una disminución significativa del 54.1% respecto al inicial ( $p<0.05$ ) y del 57.3% con relación a las 24 horas ( $p<0.05$ ) (Tabla 1, Figura 4).

**Tabla 1.** *Parámetros espermáticos de semen equino en los diferentes tiempos de refrigeración. Los datos están presentados como porcentaje del valor inicial (Fresco).*

PARAMETROS TIEMPOS DE REFRIGERACIÓN	% MOVILIDAD	% VIABILIDAD	% HOST
24 HORAS	$91.67 \pm 6.84$	$85.40 \pm 8.01$	$103.19 \pm 7.44$
48 HORAS	$21.79 \pm 3.42$	$21.8 \pm 8.94$	$45.86 \pm 21.77$

**Figura 4.** Efecto del tiempo de refrigeración sobre la funcionalidad de la membrana de espermatozoides equinos. Los espermatozoides fueron refrigerados durante 24 y 48 horas. Los datos son presentados como porcentaje promedio con respecto al control (Fresco)  $\pm$  Error Estándar.  $n=5$  machos, y tres repeticiones de cada animal. Letras diferentes presentan diferencia estadística ( $p<0.05$ ).



En cuanto a los tres parámetros evaluados, (viabilidad, movilidad y HOST) se observó que se conservan sin cambios considerables durante las primeras 24 horas de refrigeración, probablemente debido a la composición del diluyente que le brinda al espermatozoide los elementos necesarios para realizar sus funciones. Estos resultados son similares a los encontrados por Bielanski <sup>(6)</sup>, quien reportó un efecto del diluyente sobre la conservación de características evaluadas en este trabajo.

Los resultados encontrados del efecto del tiempo de refrigeración sobre los parámetros espermáticos concuerdan con lo reportado por Cottorello <sup>(9)</sup>, quien encuentra un efecto significativo utilizando el diluyente Kenney sobre el mantenimiento de la movilidad progresiva y el vigor del espermatozoide sólo en el día 1, a una temperatura que varía entre 0 y 10°C centígrados, mientras que por encima de las 24 horas de refrigeración, no tiene un efecto muy duradero.

El mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática a las 24 horas de refrigeración se pudo haber debido al contenido de colesterol en la membrana espermática, lo cual hace menos susceptibles a los espermatozoides al daño causado por el choque térmico, mecanismo que ha sido evaluado en otras especies con mayores contenidos de colesterol en la membrana espermática <sup>(23)</sup>. Sin embargo, la disminución de espermatozoides reaccionados al Test Hiposmótico a las 48 horas pudo ser consecuencia de alteraciones en los componentes de la membrana plasmática que contribuyen al transporte de iones o metabolitos, efectos que han sido encontrados en el semen congelado <sup>(8)</sup>. Usualmente, en nuestro medio son utilizadas diferentes técnicas para evaluar la función de la membrana espermática, entre ellas, tinciones que usan colorantes que no atraviesan la membrana plasmática intacta, pero los espermatozoides son teñidos si la membrana está dañada <sup>(12,14)</sup>.

Sin embargo, estos métodos de evaluación no detectan cambios funcionales en la membrana que

pueden afectar procesos como la fertilización, por lo que se hace necesario implementar técnicas como el HOST en la evaluación rutinaria del semen, generando resultados más acertados.

## Conclusiones

Con base en los resultados, se concluye que el semen equino se puede refrigerar por 24 horas sin tener mayores alteraciones o cambios en sus parámetros, debido a la acción que ejerce el diluyente sobre los espermatozoides; sin embargo, no es recomendable almacenar el semen por tiempos muy prolongados, ni realizar inseminación, debido a que las características que hacen funcional al espermatozoide disminuyen drásticamente a las 48 horas de refrigeración.

Estos resultados nos comprometen con la búsqueda y evaluación de nuevos diluyentes y componentes que mantengan las características del espermatozoide equino por tiempos de refrigeración más prolongados.

## Agradecimientos

Se agradece profundamente al Instituto de Ciencias de la Salud (CES) (facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia), al Doctor Santiago Henao, al Instituto de Medicina Tropical; biólogas y bacteriólogas, al Doctor Andrés Trujillo, director del Instituto de Medicina Tropical, la Clínica San Luís y al Doctor Neil Vásquez por hacer posible la realización de esta investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ALVARENGA, M.A., LEO, K.M., PAPA, F.O., LANDIM-ALVARENGA, F.C., MEDEIROS, A.S.L., GOMES, G.M. 2003. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: Proceedings, Workshop on Transporting gametes and Embryos, Havemeyer Foundation. 74-76
2. ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., LANDIM-ALVARENGA, A.S.L., MEDEIROS. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal reproduction science* 89: 105-113.
3. ARRUDA, R.P., BALL, B.A., GRAVANCE, C.G., GARCIA, A.R. and LIU, L.K.M. 2002. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology*, 58: 253-256.
4. BALL, B.A., BAUMBER, J. and SABEL, K. 2002. Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 58: 299-300.
5. BAUMBER, J., BALL, B.A., LINFOR, J.J. and MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. *Theriogenology*. 58: 301-302.
6. BIELANSKY, W. 1950. Characteristics of the semen stallions. Macro and microscopic investigations with estimation of fertility. *Memb. Acad. Pol.sci.* 16: 1-58
7. BRUEMMER, J.E., REGER, H., ZIBISKI, G. and SQUIRES, E.L. 2002. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 58: 405-407.
8. CORREA, J.R., ZAVOS, P.M. 1994. The hiposmotic swelling test: is employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42: 351-360.

9. COTORELLO, A.C.P.; AMANCIO, R. C.; HENRY, M.; BORGES, I. 2002. Effect of strange temperature and extenders on "in vitro" activity of donkey spermatozoa. *Theriogenology*, 58: 325-328.
10. DEVIREDDY, R. V.; SWANLUND, D. J.; ALGHAMDI, A. S.; TROEDSSON, M.H.T.; BISCHOF J. C. and ROBERTS, K.P. 2002. The effect of collection and cooling conditions on water transport characteristics of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 58: 233-236.
11. DOTT, II.; FOSTER G. C. 1972. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are cosinophilic in a differential "live/dead" stain. *J. Reprod. Fertil.* 29: 443-445.
12. GRAHAM, J. K. 1996. Analysis of stallion semen and relation to fertility. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 12: 119-130
13. HENRY M.; SNOECK P. N. and COTTORRELO A. C. P. 2002. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology*, 58: 245-248.
14. MAGISTRINI, M.; GUTTON, E.; LEVERN, Y.; NICOLLE, J.C.; VIDAMENT, M.; KERBOEOP, D.; and PALMER, E. 1997: New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology* 48: 1229-1235.
15. NEILD, D. G.; CHAVES, M.; FLORES, N.; MORA, M.; VECONI and AGÜERO, A. 1999. Hypotonic Test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 51:721-727.
16. PARLEVLIET, J.; KEMP, B.; COLENBRANDER, B. 1994: Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warm blood stallions. *J. Reprod. Fertil.* 101: 183-187.
17. PICKETT, B. W. 1993. Factors affecting sperm production and output. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. *Equine Reproduction*. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 755-768.
18. TAMULI, M. K.; WATSON, P. F.; 1992. Effect of temperature of incubation on development of resistance to cold stress and hypotonic stress in boar spermatozoa incubated for up to 24 hours. *Proc.12 th. Int. cong. anim. Reprod.* 1484-1486
19. VARNER, D. D.; THOMPSON, J. A.; BLANCHARD, T. L.; HECK, R.; LOVE, C.C., BRINSKO, S.P. and JOHNSON, L. 2002. Induction of acrosome reaction in stallion spermatozoa: effects of incubation temperature, incubation time, and ionophore concentration. *Theriogenology*, 58: 303-306.
20. VIDAMENT, M. ; DAIRE, C. ; YVON, J. M. ; DOLIGEZ, P. ; BRUNEAU, B. ; MAGISTRINI, M and ECOT, P. 2002. Motility and Fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology*, 58: 249-251.
21. WATSON, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*;7: 871-891.
22. WATSON, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science* 60-61: 481-492.
23. ZAHN, F. S., PAPA, F. O. and DELL'AQUA, J.; R. J.A. 2002. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology*, 58: 237-240.