ISSN: 3061-810X
Año 2, Núm. 1, Septiembre -Diciembre 2025 pp. **1**

Efecto de diferentes crioprotectores sobre la viabilidad de espermatozoides de verraco en trópico.

Wilfrido Navarrete Rios[1*]; Efrén Estrada Paqui[2]; Raúl Ulloa Arvizu[3]; Julio C. Gómez Vargas[2]; José L. Ponce Covarrubias[4]

[1]Maestría en Ciencias de la Producción Animal, Universidad Autónoma de Guerrero [2]Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero [3]Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México [4]Escuela Superior de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 3, Universidad Autónoma de Guerrero

Área: Ciencias agropecuarias.

Resumen

El objetivo del estudio fue determinar el efecto de diferentes crioprotectores sobre la viabilidad espermática. Se utilizaron 10 eyaculados de 3 verracos. Se tomaron muestras de semen de 40 mL (30x106 espermatozoides/mL). El diseño experimental fue completamente al azar con mediciones repetidas. Se formaron cinco tratamientos con glicerol (G) y trehalosa (TR); T1: G 6 % - TR 0; T2: G 3 % - TR 50 mM; T3: G 3 % - TR 100 mM; T4: G 1.5 % - TR 100 mM; y T5: G 1.5 % - TR 50 mM. Se utilizaron pajillas de 0.5 mL con 500x106 de espermatozoides; posteriormente, se congelaron y almacenaron en termo criogénico. Se descongelaron dos pajillas por tratamiento a 38 ºC por agitación durante 20 s y se diluyeron con VITASEM® (dilución 1:3). La viabilidad se determinó en microscopía de epifluorescencia. El porcentaje de viabilidad para los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5 fueron 56.4 ± 0.5; 55.5 ± 0.5; 54.3 ± 0.5; 53.5 ± 0.5 y 52.5 ± 0.5, respectivamente. No mostraron diferencia entre los tratamientos 1 y 2 (P> 0.05), pero sí en los tratamientos 3, 4 y 5 (P< 0.05). Se observó mayor viabilidad con glicerol 6 % y glicerol 3 % y trehalosa 50 mM. En conclusión, una mezcla de 3 % de glicerol con trehalosa 50 mM y 0.25 % de miel de abeja deshidratada es una opción para la conservación de espermatozoides de cerdo. Esto puede ser útil para la inseminación artificial en granjas de la Región de Tierra Caliente de Guerrero.

Palabras clave: trehalosa, miel de abeja deshidratada, verraco, viabilidad.

Abstract

The objective of the study was to determine the effect of different cryoprotectants on sperm viability. Ten ejaculates from three boars were used. Semen samples of 40 mL were taken ($30x10^6$ sperm/ mL). The experimental design was completely randomized with repeated measurements. Five treatments were formed with Glycerol (G) and Trehalose (TR); T1: G 6% - TR 0; T2: G 3% - TR 50 mM; T3: G 3% - TR 100 mM; T4: G 1.5% - TR 100 mM; and T5: G 1.5% - TR 50 mM. 0.5 mL straws with $500x10^6$ of sperm were used, subsequently frozen and stored in a cryogenic thermos. Two straws per treatment were thawed at 38 ºC by shaking for 20 s and

diluted with VITASEM® (1:3 dilution). Viability was determined by epifluorescence microscopy. The percentage viability for treatments 1, 2, 3, 4 and 5 were 56.4 ± 0.5; 55.5 ± 0.5; 54.3 ± 0.5; 53.5 ± 0.5 and 52.5 ± 0.5 respectively. They showed no difference between treatments 1 and 2 (P> 0.05), but did differ in treatments 3, 4 and 5 (P< 0.05). Greater viability was observed with 6% glycerol and 3% glycerol with 50 mM trehalose. In conclusion, 3% glycerol with 50 mM trehalose and 0.25% dehydrated honey is an alternative for cryopreservation of porcine sperm, and may be an option for implementing artificial insemination on farms in the Tierra Caliente Region of Guerrero.

Keywords: trehalose, dehydrated honey, boar, viability.

Introducción

La inseminación artificial (IA) es la tecnología reproductiva más empleada en la especie porcina, siendo utilizada de manera rutinaria en las granjas de producción porcina. Así, a finales del 2020, más del 80 % de las hembras reproductoras a nivel mundial eran inseminadas, actualmente se realizan alrededor de 25 millones de inseminaciones cada año. De ellas, el 98 % se llevan a cabo con semen diluido conservado a 17 ºC durante 1 - 5 d, a una concentración de 2 a $3x10^9$ de espermatozoides por dosis de IA (Jia *et al.*, 2021). En los últimos años los protocolos de criopreservación e inseminación han sido mejorados sustancialmente con nuevos sistemas de envasado, optimizado del protocolo de congelación y mejores extensores de congelación repercutiendo positivamente en la mejor calidad espermática después de la descongelación que asociado a las técnicas de inseminación como la postcervical han permitido alcanzar una excelente fertilidad y prolificidad empleando solo dosis espermáticas de 500 a 1 $000x10^6$ de espermatozoides (Roca *et al.*, 2011). Para lograr un porcentaje aceptable de gestación con semen criopreservado de verraco es necesario tener una buena detección de estro de la hembra, ya que puede ofrecer resultados similares a los obtenidos con semen diluido a 17 ºC, con tasas de parto superiores al 80 % y un tamaño de camada de 12.5 lechones (Estrada-Paqui y Martínez, 2017).

El glicerol es el crioprotector de primera elección, ya que penetra dentro de la célula espermática y evita la formación de cristales de hielo intracelulares y la concentración de electrolitos. Así mismo, las concentraciones de glicerol que se utilizan deben ser de no más del 6.5 % ya que resulta tóxico para el espermatozoide afectando la viscosidad citoplasmática, la síntesis y utilización del ATP (Holt, 2000). En la actualidad se ha investigado otros agentes crioprotectores menos dañinos al espermatozoide, tales como los agentes crioprotectores no penetrantes dentro de estos, los azucares como la trehalosa y sacarosa, ya que estos favorecen la excreción

de agua fuera de la célula, a fin de disminuir la formación de cristales de hielo intracelulares (Bittencourt *et al.*, 2018).

La trehalosa es un disacárido no reductor. Conjuntamente, es un estabilizador de biomoléculas, incluyendo proteínas. A la trehalosa se le adjudican diferentes propiedades fisicoquímicas como son la antioxidación, crioprotector y su participación en la glucólisis. Así mismo, la trehalosa es capaz de estabilizar los fosfolípidos y proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide porcino, incidiendo positivamente en la capacidad de resistir mejor al proceso de criopreservación (Jafaroghli *et al.*, 2011). En este contexto, Athurupana et al. (2015) mencionan que al utilizar 100 mM de trehalosa para la criopreservación del espermatozoide de verraco obtuvieron mejores resultados de integridad de la membrana plasmática (viabilidad), esto disminuyendo la concentración de glicerol al 3 y 1.5 %. Adicionalmente, Tonieto et al. (2010) probaron niveles de glicerol de 3 % y 1.5 % combinado con trehalosa 100 mM, obteniendo resultados positivos en la calidad del semen criopreservado de ovino. Por su lado, Gutiérrez et al. (2009) indican la mejor protección de la membrana plasmática con 42.25 % al utilizar 1 % de glicerol y 250 mM de trehalosa en semen de verraco descongelado.

También, a la trehalosa se le atribuye un efecto a nivel osmótico sobre la célula espermática muy parecido al glicerol, lo cual le permite deshidratar y rehidratar a la célula durante el proceso de congelación y descongelación, y esto puede mejorar la calidad del semen criopreservado de verraco (Athurupana *et al.*, 2015). Así mismo, la trehalosa participa en la glucólisis que es la principal ruta metabólica por medio de la cual el espermatozoide de verraco produce energía para mantener su movilidad y otras funciones, teniendo de esta forma la trehalosa un efecto positivo sobre la calidad del semen criopreservado (Bittencourt *et al.*, 2018; Jia *et al.*, 2021). Otro aditivo de reciente utilización como crioprotector no penetrante y fuente energética para el espermatozoide de verraco es la miel de abeja, la cual tiene un efecto osmótico parecido a la trehalosa y actúa también sobre el gasto energético a nivel glucolitico, y por tanto mejora los parámetros de cinemática espermática de movilidad, viabilidad e integridad del acrosoma de acuerdo a Balogun et al. (2021) y Balogun et al. (2023). El objetivo fue determinar el efecto de diferentes crioprotectores sobre la viabilidad espermática.

Metodología

Se utilizaron tres verracos de línea genética comercial del Centro de Transferencia Genética (CTG), categorizados como buenos congeladores, de la Facultad de Medicina

Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), perteneciente a la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro). De 30 a 36 meses de edad, los cuales están alojados en corrales de 4 x 2 m. La alimentación de 2.5 Kg/ día, basada con 14 % de proteína, 2.9 Mcal/ EM y 0.6 % de lisina. La recolección de semen se realizó por la técnica de la mano enguantada, una vez por semana alternando cada verraco (Gutiérrez *et al.*, 2009). Se utilizaron 10 eyaculados y la evaluación de semen se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción de Monogástricos, donde se evaluaron los estimadores macroscópicos y microscópicos del semen de acuerdo a la técnica descrita por Estrada-Paqui y Martínez (2017). Para la dilución de semen se utilizó el extensor de mediana conservación VITASEM® y el almacenamiento en cámara de temperatura controlada de 17 ºC. Se tomaron muestras de semen completo de 40 mL ($30x10^6$ espermatozoides/ mL) después de la recolección y se diluyo 1:3 (v/v), 40 mL semen y 120 mL diluyente. 24 h después del almacenamiento se procedió a la analítica seminal de referencia (movilidad y viabilidad) del semen. Brevemente se procedió a realizar el protocolo de enfriamiento y congelación descrito por Estrada et al. (2014), iniciando con la centrifugación del semen a 2400 rpm/ 5 min, posteriormente se reconstituye el pellet con 335 µL de medio LEY por cada tubo graduado cuidando la temperatura del medio LEY y semen. Se realizó la analítica seminal (movilidad, viabilidad y concentración) para posteriormente el reajuste de la concentración con 1990 µL con solución espermática y 10 µL de semen reconstituido. Se añadió el LEY restante al semen reconstituido. Se pasó a refrigeración durante 120 min (tasa de enfriamiento de 0.1 ºC/ minuto) hasta llegar a los 5 ºC.

El diseño experimental fue completamente al azar con mediciones repetidas y se formaron cinco tratamientos con Glicerol (G) y Trehalosa (TR); T1: G 6 % - TR 0; T2: G 3 % - TR 50 mM; T3: G 3 % - TR 100 mM; T4: G 1.5 % - TR 100 mM; y T5: G 1.5 % - TR 50 mM. Se adiciono miel de abeja deshidratada (MAD) al 0.25 % fija para los tratamientos del 2 al 5, y lauril sulfato de sodio (SLS) fue fijo para todos los tratamientos. Se procedió al llenado de pajillas de 0.5 mL con $500x10^6$ de espermatozoides y fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido durante 10 min sobre una base a 5 cm del nitrógeno y depositadas en termo criogénico para su almacenamiento.

Para la evaluación de la viabilidad de los espermatozoides se utilizó el kit comercial FluoVit® (Microptic) bajo microscopia de epifluorescencia. Se descongelaron dos pajillas por tratamiento en baño maria a 38 ºC por agitación durante 20 s y se diluyo en VITASEM® 1:3 (v/v), posteriormente se efectuó una dilución de 1:20 (v/v) (10 µL semen/ 200 µL diluyente). Se tomó una

ISSN: 3061-810X
Año 2, Núm. 1, Septiembre -Diciembre 2025 pp. **5**

muestra de semen de 10 µL y de coloco en un vial, se añadieron 10 µL de Hoechst (33342) y se dejó incubar en oscuridad durante 5 min en baño seco a 38 ºC, seguido se agregó 4 µL de IP (yoduro de propidio) y se incubo en obscuridad durante 5 min; por último, se adiciono 2 µL de formaldehido al 1 % y se dejó incubar durante 5 min para fijar los espermatozoides. Se colocaron 10 µL de la muestra sobre un portaobjetos y se examinó bajo un microscopio de epifluorescencia (Microscopio invertido Nikon Eclipse E200MV R, Nikon, España) con el objetivo de 20x, provisto del software Sperm Class Analyzer-SCA 5, con módulo de vitalidad espermática. Donde los espermatozoides se clasificaron en dos poblaciones: vivos con membrana plasmática intacta (Hoechst (33342)+/ IP-) los cuales se tiñen de color azul y muertos con membrana plasmática dañada (Hoechst (33342)-/ IP+) los cuales se tiñen de color rojo. Se realizó doble prueba por cada muestra contando 200 espermatozoides y el resultado fue expresado en porcentaje

El análisis estadístico se llevó a cabo por comparación de medias y análisis de varianza (ANOVA) entre tratamientos con una significancia de P <0.05, en el paquete estadístico SPSS ver. 27.

Resultados y discusión

La combinación de glicerol, trehalosa con miel de abeja deshidratada mantienen el porcentaje de viabilidad por encima del 50 % del semen de verraco criopreservado. Así mismo, se ha descrito que la adición de azúcares al medio de congelación tiene efectos positivos sobre la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide después de la descongelación (Malo *et al.*, 2010).

El porcentaje de espermatozoides viables en el presente estudio, no mostro diferencia entre los tratamientos 1 y 2 (P> 0.05), pero si en los tratamientos 3, 4 y 5 (P< 0.05), donde se observó la viabilidad fue menor cuando se utilizó 1.5 % de glicerol, 50 mM de trehalosa con 0.25 % de miel de abeja deshidratada; el mayor porcentaje de espermatozoides vivos con glicerol 6 % y glicerol 3 %, trehalosa 50 mM con 0.25 % de miel de abeja deshidratada (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de los tratamientos sobre la integridad de la membrana plasmática (viabilidad), a la descongelación (se presenta la media ± error estándar).

Tratamiento	Viabilidad (%)
G 6 % - TR 0	56.4 ± 0.5[a]
G 3 % - TR 50 mM	55.5 ± 0.5[a]
G 3 % - TR 100 mM	54.3 ± 0.5[b]
G 1.5 % - TR 100 mM	53.5 ± 0.5[b]
G 1.5 % - TR 50 mM	52.5 ± 0.5[b]
P valor	0.001

[a,b,c] Literales distintas dentro de columnas indican diferencias significativas entre tratamientos (P< 0.05). Tratamientos: **T1**: G 6 % - TR 0; **T2**: G 3 % - TR 50 mM; **T3**: G 3 % - TR 100 mM; **T4**: G 1.5 % - TR 100 mM; **T5**: G 1.5 % - TR 50 mM.

Estos resultados concuerdan parcialmente a los reportados por Gutiérrez et al. (2009) que indican la mejor protección de la membrana plasmática con 42.25 % al utilizar 1 % de glicerol y 250 mM de trehalosa en semen de verraco descongelado. Este resultado difiere a

lo encontrado por Choi et al. (2014) quienes señalan que al utilizar 100 mM de trehalosa en el medio de congelación encontraron una mejor protección teniendo una viabilidad del 39.7 % en semen de verraco descongelado, lo cual difiere a lo encontrado en la presente investigación. Tuty et al. (2017) mencionan que la adición 100 mM de trehalosa y 4 % de glicerol en el diluyente para congelación, optimizo la protección de la membrana plasmática (viabilidad) en el espermatozoide porcino a la descongelación alcanzando un 70.8 %. Por su parte, Hu et al. (2009), indican que la incorporación de trehalosa 100 mM en el medio de congelación incremento la viabilidad teniendo un 44.61 % en semen de verraco descongelado. En otro estudio llevado a cabo por Domínguez et al. (2023) al utilizar diferentes crioprotectores demostraron que con 375 mM de trehalosa se obtuvieron los mejores resultados de viabilidad con un 69 % en semen de verraco criopreservado, mientras Silva et al. (2015) probaron diferentes concentraciones de dimetilformamida y glicerol en combinación con tres diferentes tipos de azúcar (agua de coco en polvo, lactosa y trehalosa) en el medio de enfriamiento, en donde la combinación de glicerol al 3 % y trehalosa 250 mM alcanzó el mejor porcentaje de viabilidad con 40 % en semen criopreservado de verraco. Mendoza-Viveros et al. (2022) al utilizar 300 mM de trehalosa y un 10 % de liposomas en el medio de congelación reportaron un 28.22 % de viabilidad en semen criopreservado de verraco. Por último, el tratamiento 2 con 3 % de glicerol, 50 mM de trehalosa con 0.25 % de miel de abeja deshidratada mantuvo de mejor forma la viabilidad de los espermatozoides en un 55.5 %, esto puede ser debido al efecto sinérgico que posee la combinación de bajos niveles de glicerol y trehalosa (Öztürk *et al.*, 2020). En cuanto a la utilización de la miel de abeja deshidratada como un efecto adicional crioprotector no penetrante, con derivación beneficiosa de la miel de abeja sobre la viabilidad de los espermatozoides a la descongelación (Sarmadi *et al.*, 2019). En este sentido, Balogun et al. (2023) al utilizar diferentes niveles de inclusión de miel de abeja en el medio de congelación obtuvieron los mejores resultados con 0.25 %, teniendo una mejor viabilidad en el semen criopreservado de verraco. En semen descongelado de toro Chung et al. (2019) con la inclusión del 1 % miel de abeja en el medio de criopreservación encontró los mejores resultados de viabilidad con un 65 %.

Conclusiones

En conclusión, la combinación de glicerol 3 % y 50 mM de trehalosa es una alternativa para la criopreservación espermática de los porcinos, y puede ser una opción para implementar la inseminación artificial en granjas en condiciones de trópico.

Referencias bibliográficas

Athurupana, R., Takahashi, D., Loki S., y Funahashi, H. (2015). Trehalose in glycerol-free freezing extender enhances post-thaw survival of boar spermatozoa. *Journal Reprod Dev*, 61(3), 205-10. https://doi: 10.1262/jrd.2014-152.

Balogun, K. B., Nicholls, G., Sokunbi, O. A., y Stewart, K. R. (2021). PSV-9 Effects of Natural Honey Inclusion in Dilution and Freezing Extenders on Frozen-thawed Semen Quality in Boars. *Journal of Animal Science*, (99), 211.
https://doi.org/10.1093/jas/skab054.346

Balogun, K. B., Nicholls, G., Sokunbi, O. A., y Stewart, K. R. (2023). Cryoprotectant effects of natural honey on spermatozoa quality of pre-freezing and frozen-thawed boar semen. *Journal of Animal Science*, (101), 1-12. doi: 10.1093/jas/skac384.

Bittencourt, R. F., Oba, E., de Almeida Biscarde, C. E., Azevedo, H. C., Bittencourt, M. V., de Menezes, G. F., da Silva Lima, A., da Mata Fuchs, K., y de Lisboa Ribeiro Filho A. (2018).
Dimethylacetamide and trehalose for ram semen cryopreservation. *Cryobiology*, (85), 1-6.
https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.10.266

Choi, S. H., Lee, M. J., Lee, K. M., Sa, S. J., Kim, H. J., y Jin, H. J. (2014). Effect of supplementation of trehalose, glycerol on conventional freezing and vitrification of boar sperm. *Journal of Embryo Transfer*, 29(4); 397-401.
http://dx.doi.org/10.12750/jet.2014.29.4.397

Chung, E.L., Nayan, N., Nasir, N.S., Hing, P.S., Ramli, S., Rahman, M.H., & Kamalludin, M.H. (2019). Effect of honey as an additive for cryopreservation on bull semen quality from different cattle breeds under tropical condition. Journal of Animal Health and Production, 7(4), 171-178. doi:10.17582/journal.jahp/2019/7.4.171.178

Domínguez, R. Á., Herrera, H. J., Ramón, U. J., Aguilar, U. E., Loeza, C. H., y Sanginés, G. J. (2023). Efecto de diferentes crioprotectores sobre la criopreservación del semen de cerdo Pelón Mexicano. Abanico Veterinario. http://dx.doi.org/10.21929/abavet2023.23

Estrada-Paqui y Martínez R. (2017). Tendencias actuales de reproducción en porcino. Editorial Académica Española.

Estrada, P. E., Rodríiguez-Gil, J. E., Rocha, L. G., Balasch, S., Bonet, S. and Yeste, M. (2014). Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*, (2), 88- 99. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00144.x

Gutiérrez, P. O., Juárez, M. M. L., Uribe, C. S., y Trujillo, O. M. E. (2009). Boar spermatozoa Cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media

improves cellular integrity. *Cryobiology*, 58(3), 287-292.

Holt, W. V. (2000). Basics aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, (62), 2-32. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00152-4.

Hu, J. H., Li, Q. W., Jiang, Z. L., Yang, H., Zhang, S. S., y Zhao, H. W. (2009). The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Reprod Domest Anim.*, 44(4), 571-575. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00975.x

Jafaroghli, M., Khalili, B., Farshad, A., y Zamiri, M. J. (2011). The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*, 96, 58-63. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.11.010

Jia, B., Memon, S., Liang, J., Lv, C., Hong, Q., Wu, G., y Quan, G. (2021).Trehalose modifies the protein profile of ram spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, (171), 21-29.

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.05.004

Kamal, M. M., Alam, M. E., Das, S. K., Yeasmin, M. S., Ahmed, S., Rahman, M., Das, D. K., Gofur, M. R., y Masum, M. A. (2023). Effects of glucose and trehalose on tris-citric acid-egg yolk-fructose diluents for semen cryopreservation in goat. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 10(2), 169-177. doi: 10.5455/javar.2023.j666

Liang, J., Lv, C., Yang, H., Zhang, Y., Raza, S., Wu, G., y Quan, G. (2022). Ultrastructural modification of ram sperm frozen with cyclohexanediol and trehalose. *Biopreservation and biobanking*, (20), 1-4.

Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Cano, R., de Blas, I., y Espinosa, E. (2010). Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based

extender. *Cryobiology*, (61), 17–21. doi: 10.1016/j.cryobiol.2010.03.008

Mendoza-Viveros, C. D., Gutiérrez-Pérez, O., Bernad-Bernad, M. J., Medina-Torres, L., Monroy-Barreto, M., Gimeno, M., y Trujillo-Ortega, M. E. (2022). Boar semen cryopreserved with trehalose-containing liposomes: disaccharide determination and rheological behaviour. *Zygote*, 30(6), 895-902. doi: 10.1017/S0967199422000442

Öztürk, A. E., Bodu, M., Bucak, M. N., Ağır, V., Özcan, A., y Keskin, N. (2020). The synergistic effect of trehalose and low concentrations of cryoprotectants can improve post-thaw ram sperm parameters. *Cryobiology*, (95), 157–163.

http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.03.008

Roca, J., Parrilla, I., Rodriguez-Martinez, H., Gil, M. A., Cuello, C., Vázquez, J. M., and Martínez, E. A. (2011). Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry.

Reprod Dom Anim, (46), 9-83. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01828.x

Sarmadi, F., Kazemi, P., Tirgar, P., Fayazi, S., Esfandiari, S., y Sotoodeh, L. (2019). Using natural honey as an anti-oxidant and thermodynamically efficient cryoprotectant in embryo vitrification. *Cryobiology*, (91), 30–39.

Silva, C. G., Cunha, E. R., Blume, G. R., Malaquias, J. V., Báo, S. N., y Martins, C. F. (2015). Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology*, (70), 90–94.
doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.01.001.

Tonieto, R. A., Goularte, K. L., Gastal, G. D. A., Schiavon, R. S., Deschamps, J. C., y Lucia J. R. T. (2010). Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research*, (93), 206-209. doi:10.1016/j.smallrumres.2010.05.003

Tuty, L. Y., Raden, L. A., Reni, R. D., y Wilmientje, M. M. N. (2017). The quality of boar frozen semen in commercial extender supplemented with trehalose. *Journal Veterinari*, 18(1), 69-75. doi: 10.19087/jveteriner.2017.18.1.69

Yimer, N. N., Muhammad, K., Sarsaifi, Y., Rosnina, A., Khumran, M., and Kaka, A. (2015). Effect of honey supplementation into tris extender on cryopreservation of bull spermatozoa. *Journal Animal Science*, 18(2), 47–54.