

Efecto de los diluyentes Ley-Leygo y Triladyl y de dos tiempos de equilibrio en la congelación de semen de verraco

Effect of Ley-Leygo and Triladyl extenders and two equilibration times on the freezing of boar semen

Erika Abigail Reyes-González¹, Fernando Centurión-Castro², Nayeli Uc-Espinosa³,
Jesús Enrique Ek-Mex^{4*}, Jorge Alonso Peralta-Torres⁵,
José Candelario Segura-Correa²

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de los diluyentes Ley-Leygo y Triladyl® y de dos tiempos de equilibrio sobre la motilidad individual (MI), integridad de la membrana plasmática (IMP), actividad mitocondrial (AM) y acrosoma intacto (AI) del semen congelado-descongelado de cerdo. Se utilizó una fracción rica de un total de 20 eyaculados de cinco verracos de una línea comercial, considerados aptos para la congelación con un mínimo de 80% de motilidad y 85% de espermatozoides normales. Cada eyaculado se dividió en cuatro alícuotas: diluyentes Ley-Leygo y Triladyl® y dos tiempos de equilibrio (0 y 1 h). Las muestras de semen se descongelaron a 37 °C durante 20 s. Los resulta-

¹ Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario N.13 Xmatkuil, Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria y Ciencias del Mar, Yucatán, México

² Departamento de Reproducción Animal y Mejoramiento Genético, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México

³ Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario N.15 Bolonchén, Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria y Ciencias del Mar, Campeche, México

⁴ Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario N.283 Hocabá, Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria y Ciencias del Mar, Yucatán, México

⁵ División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México

*E-mail: jeemvz@hotmail.com

Fuente financiera: Fundación Produce Yucatán, AC.

Recibido: 23 de abril de 2022

Aceptado para publicación: 31 de octubre de 2022

Publicado: 22 de diciembre de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

dos de la MI y la IMP no tuvieron efectos significativos para los factores evaluados ($p > 0.05$). Hubo diferencia significativa para la AM ($p < 0.05$) entre los diluyentes de Ley-Leygo (43.57%) y Triladyl® (51.7%). El porcentaje de AI fue de 46% para Ley-Leygo y de 25% para Triladyl® ($p < 0.05$). El porcentaje de AI con el tiempo de equilibrio de 1 h fue mayor que el de 0 h ($p < 0.05$). Se concluye que el diluyente Triladyl® mejoró la AM y el tiempo de equilibrio de 1 h mejoró el porcentaje de AI.

Palabras clave: criopreservación, semen congelado, reproducción, eyaculado

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of Ley-Leygo and Triladyl® extenders and two equilibrium times on individual motility (IM), plasma membrane integrity (PMI), mitochondrial activity (MA) and intact acrosome (IA) in frozen-thawed boar semen. A rich fraction of a total of 20 ejaculates from five boars of a commercial line was used. All ejaculates had a minimum of 80% motility and 85% normal spermatozoa. Each ejaculate was divided into four aliquots: Ley-Leygo and Triladyl® extenders and two equilibrium times (0 and 1 h). The semen samples were thawed at 37 °C for 20 s. The results of the IM and the PMI did not have significant effects for the factors evaluated ($p > 0.05$). There was a significant difference for MA ($p < 0.05$) between the Ley-Leygo (43.57%) and Triladyl® (51.7%) diluents. The IA was 46% for Ley-Leygo and 25% for Triladyl® ($p < 0.05$). The percentage of IA with the equilibration time of 1 h was greater than that of 0 h ($p < 0.05$). It is concluded that the Triladyl® diluent improved the MA and the equilibration time of 1 h improved the percentage of IA.

Key words: cryopreservation, frozen semen, reproduction, ejaculate

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una de las biotecnologías reproductivas que permite el uso más eficiente del macho y su empleo se encuentra ampliamente difundido en la especie porcina; sin embargo, solo el 1% de los servicios de IA se realizan con semen congelado (Didion *et al.*, 2013). El uso de espermatozoides criopreservados se encuentra limitado, en parte debido a la menor tasa de fertilidad y prolificidad que se obtiene en comparación con las del semen fresco. No obstante, entre las ventajas que conlleva su aplicación incluye mayor aprovechamiento de los verracos de alto valor genético, la eliminación de riesgos sanitarios, aprovechamiento del semen en épocas reproductivas

desfavorables y ventajas en el comercio internacional de semen congelado (Pezo *et al.*, 2019; Jovièia *et al.*, 2020).

La menor fertilidad y prolificidad del semen congelado de porcinos en comparación con el semen refrigerado se debe probablemente a la mayor sensibilidad de los espermatozoides al proceso de congelación en comparación con otras especies, donde las temperaturas de congelación afectan a la membrana plasmática y acrosomal (Yeste *et al.*, 2017; Pezo *et al.*, 2019; Jovièia *et al.*, 2020). Para prevenir estos daños y mejorar los resultados de fertilidad del semen descongelado se han realizado diferentes modificaciones a los protocolos de congelación, incluyendo el uso de diluyentes basados en la utilización de la yema de huevo y de glicerol

como agentes crioprotectores, o de concentraciones elevadas de azúcares aunado a la adición de un detergente (Orvus et paste) (Yeste *et al.*, 2017; Jovièiæ *et al.*, 2020).

Triladyl® es un diluyente ampliamente utilizado para la criconservación de semen de bovinos, ovinos y caprinos (Rekha *et al.*, 2016; Miguel-Jimenez *et al.*, 2020), pero existe escasa información sobre su empleo en semen porcino (Lee *et al.*, 2010, 2015). Es importante destacar que uno de los componentes del Triladyl® es el Tris (hidroximetil aminometano) que se utiliza en el protocolo de congelación de verracos de Pursel y Johnson (1975), y en la preparación del diluyente de congelación Beltsville 5, siendo junto con el Ley-Leygo, uno de los más utilizados (Yeste *et al.*, 2017; Pezo *et al.*, 2019).

Otro aspecto importante relacionado con el procesamiento y la congelación del semen es el tiempo de equilibrio aplicado; es decir, el tiempo que debe transcurrir después de incorporar el crioprotector hasta el momento en que el semen se somete a la temperatura de congelación. Si bien se ha reportado que el tiempo de equilibrio influye en la motilidad espermática a la descongelación, en la integridad de la membrana espermática, en el porcentaje de actividad mitocondrial de los espermatozoides y en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, los resultados aún son contradictorios (Schäfer *et al.*, 2017; Passarelli *et al.*, 2020).

En México existe escasa información sobre el diluyente adecuado para la congelación del semen porcino y del efecto de los tiempos de equilibrio durante el proceso de criopreservación para minimizar el daño celular durante la congelación en esta especie. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los diluyentes Ley-Leygo y Triladyl® y dos tiempos de equilibrio sobre la motilidad individual, la integridad de la membrana plasmática, la actividad mitocondrial y el acrosoma intacto del semen congelado-descongelado de cerdo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio del Departamento de Reproducción y Mejoramiento Genético del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán, ubicado en Mérida, Yucatán, México. El clima de la región es tropical subhúmedo tipo Aw0, con una precipitación pluvial anual de 983 mm, una humedad relativa entre 75 y 80% y temperatura anual entre 25 y 28 °C.

Procedimientos

Se utilizaron cinco verracos de la línea PIC 337, de entre 2 y 3 años de edad, todos bajo el mismo régimen de manejo y alimentación de la granja. El semen se obtuvo con el método de la mano enguantada, recogiendo únicamente la fracción rica del eyaculado. Las colectas de semen se realizaron a intervalos de 5 a 7 días obteniendo cuatro eyaculados de cada verraco. Las muestras fueron colocadas de inmediato en probetas graduadas en el baño a 37 °C para su evaluación.

Se determinó el volumen del eyaculado a través de la observación directa de la probeta graduada, la motilidad masal (MS) mediante una gota de semen que se colocó en un portaobjetos y se observó con microscopía de campo brillante utilizando el objetivo 100x. La MS se calificó en cruces (0 a 5), siendo cinco la calificación más alta. Además, se colocó una gota de semen en un portaobjetos con un cubreobjetos para observar la motilidad espermática individual (MI) con el objetivo de 400x. Para esto, se evaluó el tipo de movimiento y se puntuó el porcentaje de motilidad de los espermatozoides (0-100%) tras observar tres o cuatro campos del frotis. Finalmente se realizó una dilución 1:1 con Beltsville Thawing Solution (BTS).

El semen diluido con BTS fue depositado en tubos Falcon de 50 ml dentro de un termo y se transportó al laboratorio para continuar el proceso. Allí se evaluó nuevamente el semen para verificar que la muestra conservara una MI no inferior al 80%. Las muestras permanecieron durante 1 h a 24 °C. En el entretiempo se evaluó la concentración espermática tomando 0.1 ml de semen que fue diluido 1:100 con 99.9 ml de solución salina fisiológica con azul de metileno y formol al 1%. Con la ayuda de una pipeta Pasteur, se tomó una porción de esta preparación y se llenó una cámara Burkner. Finalmente, con el objetivo de 400x se procedió a contar los espermatozoides expresando el resultado como número de espermatozoides por mililitro.

Para evaluar la morfología espermática se preparó una solución con formaldehído al 1% y semen puro. Se tomó una gota de esta mezcla y se determinó la morfología en el microscopio de contraste de fase a 1000x. Se contaron 100 espermatozoides por muestra y se determinó el porcentaje de anomalías primarias o secundarias (Yoval-Montemira *et al.*, 2020).

Los eyaculados que se utilizaron para la congelación debían tener al menos 80% de espermatozoides normales y 85% de MI (Roca *et al.*, 2006).

Diluyentes de Congelación y Tratamientos

Los diluyentes utilizados para la congelación fueron Ley-Leygo (Lactosa y yema de huevo), siguiendo el protocolo de Westendorf *et al.* (1975) y el diluyente comercial Triladyl® (Minitüb, Alemania). El diluyente Ley-Leygo consta de una fracción (Ley) compuesta por 80% de agua destilada estéril, 20% de yema de huevo, 8.49 g de lactosa B y 40 µl de kanamicina, y una segunda fracción (Leygo) que incluye 92.5% de la fracción Ley, 6% de glicerol y 1.5% del detergente Orvum Paste. El diluyente Triladyl® está compuesto por glicerol, citrato

de sodio, fructosa, ácido cítrico, Tris (hidroximetilaminometano), lincomicina y estreptomina. En la preparación de este diluyente se utilizó 60% de agua destilada, 20% de yema y 20% de Triladyl®.

Cada muestra de semen se dividió en cuatro partes iguales en tubos Falcon de 15 ml. Dos tubos se diluyeron con el primer diluyente (LEY-Leygo) y los dos tubos restantes con Triladyl®. Asimismo, con cada diluyente se trabajó con dos tiempos de equilibrio, 0 y 1 h. Los tratamientos quedaron como sigue:

- T1: Diluyente LEY-Leygo + 0 h de tiempo de equilibrio
- T2: Diluyente Triladyl® + 0 h de tiempo de equilibrio
- T3: Diluyente LEY-Leygo + 1 h de tiempo de equilibrio
- T4: Diluyente Triladyl® + 1 h de tiempo de equilibrio

Congelación del Semen

Se utilizó el proceso de congelación descrito por Westendorf *et al.* (1975) y modificado por Thurston *et al.* (1999). Las muestras en tubos Falcon de 4 a 15 ml fueron colocadas en una conservadora a 16 °C durante 3 h (previamente 1 h a 24 °C). Luego, los tubos se centrifugaron a 800 g durante 15 min a 16 °C en una centrífuga refrigerada (Hermle, Alemania). Se eliminó el exceso de plasma seminal quedando en el tubo el pellet con los espermatozoides, al cual se añadió el diluyente correspondiente. En el caso de T1 y T3, se añadió la primera fracción (Ley), asegurando una concentración de 1500×10^6 de espermatozoides/ml para cada tubo, en tanto que para T2 y T4 se hizo una dilución buscando una concentración final de 1000×10^6 de espermatozoides/ml. A continuación, todos los tubos se sumergieron en un recipiente con agua a 16 °C, y luego a 5 °C durante 2 h. Al final de este tiempo, se añadió a las muestras de T1 y T3 la segunda fracción (Leygo) que ajustó la concentración a 1000×10^6 de espermatozoides/ml.

Las muestras de T1 y T2 (0 h de tiempo de equilibrio) fueron envasadas de inmediato en nitrógeno líquido, en tanto que las muestras de T3 y T4 permanecieron 1 h a 5 °C. Todas las muestras se envasaron en pajillas de 0.54 ml con una concentración final de 500×10^6 de espermatozoides por pajilla.

Para la congelación, las pajillas se colocaron en una rampa, a una altura de 5 cm del nitrógeno líquido contenido dentro de una caja de espuma de poliestireno, recubierta de acero para exponer el vapor de nitrógeno durante 20 min, y luego se sumergieron en el nitrógeno líquido. Las pajillas se almacenaron posteriormente en un termo con nitrógeno líquido. La descongelación se realizó a las 72 h de la congelación, en un baño de agua a 37 °C durante 20 s, agitando enérgicamente la pajilla. Finalmente se efectuó una dilución 1:1 con BTS y se esperó 1 min para la evaluación.

Evaluación del Semen Congelado-Descongelado

En el semen descongelado se evaluó la MI. Se tomó una gota de semen diluido y se observó con microscopio óptico (400x). También se cuantificó la integridad acrosomal de los espermatozoides, para lo cual se tomó una gota del semen diluido y se depositó en tubos con formol al 1%. Se evaluaron 100 espermatozoides por muestra, utilizando un microscopio de contraste de fase a 1000x, considerando acrosomas intactos (AI) aquellos que tenían una forma de medialuna oscura, clara y bien definida (Yoval-Montemira *et al.*, 2020).

La integridad de la membrana plasmática (IMP) y la actividad mitocondrial espermática (AM) se analizaron mediante la técnica de fluorescencia con diacetato de carboxifluoresceína (DCF) y rodamina 123 (Sigma-Aldrich, USA). Se mezclaron dos pajillas de cada tratamiento y se tomaron 500

μl de semen, y se llevaron a un cuarto oscuro (requerido por las características químicas de las tinciones) para agregar 20 μl de DCF y 6 μl de rodamina. Se incubó a 37 °C durante 10 min. Luego se tomaron 4 μl de la muestra para su observación en un microscopio de epifluorescencia (Olympus, Japón) a 1000x. Primero se contaron 100 espermatozoides para determinar la integridad de la membrana plasmática teniendo en cuenta cómo integrar los espermatozoides que mostraban una coloración verde en la cabeza. Posteriormente, en la misma muestra se tomó el mismo volumen y se procedió a analizar la actividad mitocondrial, considerando como espermatozoides activos aquellos que mostraban una fluorescencia verde en la sección media (Nagy *et al.*, 2003). Los resultados para ambos indicadores se expresaron en porcentaje.

Análisis Estadístico

Los datos se analizaron bajo un diseño factorial de 2x2 (dos diluyentes: Ley-Leygo y Triladyl®, y dos tiempos de equilibrio: 0 y 1 h). Cada tratamiento tuvo 20 repeticiones. Las variables dependientes estudiadas fueron los porcentajes de MI, IMP, AM y de espermatozoides con AI. Para conseguir una distribución normal, los datos se transformaron mediante la función de raíz cuadrada. Se utilizó Statgraphics Plus 5.1. Los valores se consideraron significativos cuando $p < 0.05$. Los resultados se presentan como media y error estándar de la media (EE).

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestran los resultados del estudio expresados como media y error estándar (EE). La motilidad espermática individual (MI) y la integridad de la membrana plasmática (IMP) no fueron afectadas por los diluyentes ni por los tiempos de equilibrio ($p > 0.05$).

Cuadro 1. Efecto de dos diluyentes y de dos tiempos de equilibrio en la congelación del semen de verraco

Variable	Diluyente		Valor P	Tiempo de equilibrio (h)		Valor P	Interacción Valor P	EE
	Ley-Leygo	Triladyl®		0	1			
Motilidad	29.75	26.68	0.15	25.93	30.5	0.12	0.29	1.67
Integridad de la membrana	56.97	53.77	0.26	56.01	54.67	0.55	0.50	1.94
Actividad mitocondrial	43.57	51.7	0.01	48.62	46.65	0.56	0.51	2.16
Acrosomas intactos	46.9	25	0.0001	31.62	40.32	0.002	0.051	1.75

Los valores de la actividad mitocondrial espermática (AM) fueron más altos con el uso del Triladyl® en comparación con aquellos del Ley-Leygo ($p < 0.05$); sin embargo, el tiempo de equilibrio no afectó esta variable ($p > 0.05$).

El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (AI) fue mayor con el tratamiento a base de Ley-Leygo comparado con el diluyente Triladyl® ($p < 0.001$), así como con el tiempo de equilibrio de 1 h ($p < 0.05$). Por otro lado, la interacción (diluyente x tiempo de equilibrio) no afectó ($p > 0.05$) a las variables de estudio.

DISCUSIÓN

El MI de los espermatozoides a la descongelación fue en general bajo y sin diferencias entre diluyentes ni entre tiempos de equilibrio. Estos resultados fueron similares a los reportados por Buranaamnuay *et al.* (2009) utilizando el diluyente Ley-Leygo para la congelación; no obstante, Malo *et al.* (2010) reportaron una mayor MI (59%) utilizando el

diluyente Ley-Leygo a la obtenida en el presente estudio. Por otro lado, Lee *et al.* (2011) encontraron mayor MI con Ley-Leygo que empleando Triladyl®. Estas diferencias en MI, a pesar de utilizar el mismo diluyente, probablemente se deban a la variabilidad del verraco, a la época en que se realizaron los experimentos y a otros factores como el método de congelación. En general, se espera una disminución pos-descongelación de la MI de hasta 40-50% (Salamon y Maxwell, 2000), debido al daño sufrido por las células espermáticas como consecuencia del choque de frío, el estrés osmótico, el aumento de la concentración de sales, los cambios en el pH, la desnaturalización de proteínas, la ruptura mecánica de elementos estructurales y la formación de cristales de hielo intracelulares durante el proceso de congelación y posterior descongelación (Yeste *et al.*, 2017).

Los resultados del efecto del tiempo de equilibrio sobre la MI coinciden con otros trabajos (Yi *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2013; Schäfer *et al.*, 2017). En forma similar, Herold *et al.* (2006) realizaron un estudio en búfalos utilizando Triladyl® con diferentes

tiempos de equilibrio (2-9 horas), sin encontrar diferencias significativas en MI. Generalmente, se considera adecuado utilizar entre 2 y 4 h como tiempo de equilibrio para que el crioprotector pueda penetrar la célula espermática, dependiendo de la concentración y tipo de crioprotector (Leite *et al.*, 2010).

El estudio no mostró diferencias significativas entre diluyentes ni entre tiempos de equilibrio para el IMP. Saravia *et al.* (2009), utilizando el diluyente Ley-Leygo indican que es posible alcanzar hasta 63.3% de espermatozoides con membrana íntegra a la descongelación; no obstante, los resultados de este estudio fueron similares a los reportados por Yoval-Montemira *et al.* (2020) quienes obtuvieron 55.4% de IMP, en tanto que Lee *et al.* (2015), utilizando Triladyl, solo obtuvieron 40% de IMP a la descongelación. El hecho de no encontrar diferencias entre tratamientos se podría deber a que ambos diluyentes están elaborados con yema de huevo, el cual contiene lipoproteínas de baja densidad, que recubren la membrana plasmática de los espermatozoides protegiéndola de daños durante la congelación y descongelación (Malo *et al.*, 2010; Jovièia *et al.*, 2020). Tampoco tuvo efecto el tiempo de equilibrio, probablemente debido a que los fosfolípidos de la membrana plasmática ya se encuentran estabilizados, siendo por lo tanto más resistente a los cambios que se producen durante el proceso de congelación (Yi *et al.*, 2002; Alcaj *et al.*, 2016).

Con respecto a la AM, se obtuvieron mejores resultados con el empleo del Triladyl®. Estos resultados fueron similares a los reportados por Yoval-Montemira *et al.* (2020), utilizando el diluyente Ley-Leygo. No se dispone de una explicación sólida para los resultados obtenidos con Triladyl® debido a la insuficiente información (Lee *et al.*, 2010). Sin embargo, Palacios (1994) señala que durante el descenso de la temperatura en el proceso de congelación, especialmente a 20 °C, se produce un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática debido al daño

que se produce en las bombas de iones, provocando una salida de iones, afectando a los espermatozoides, de allí que sería posible que el Triladyl®, añadido a 16 °C, proporcione una mayor protección a los espermatozoides a través del tris (hidroximetil aminometano), que tiene la función de regular el pH del medio y como consecuencia, la concentración de Ca intracelular se mantiene en niveles adecuados para estimular la producción de ATP por las mitocondrias a través de la fosforilación oxidativa (Olivera *et al.*, 2006).

En relación con el porcentaje de AI a la descongelación, hubo diferencias significativas entre diluyentes. Se obtuvieron valores más bajos de AI con el uso de Triladyl®, posiblemente debido a que este diluyente contiene 7% de glicerol (Morrier *et al.*, 2002). Se ha observado que tasas superiores al 6% de glicerol en el diluyente afectan negativamente a la integridad del acrosoma del verraco (Corcuera *et al.*, 2007). No obstante, puede que la técnica utilizada para evaluar el acrosoma, al ser subjetiva, no haya sido debidamente interpretada, ya que no hubo diferencia en la integridad de la membrana, pero sí en el acrosoma. Esto podría indicar un error en la evaluación de las muestras, ya que la yema presente en el diluyente impide la correcta visualización del acrosoma.

Khan *et al.* (2013) encontraron menor porcentaje de AI a la descongelación con un tiempo de equilibrio de 0 h (53.2%) en comparación al obtenido con 1 h de equilibrio (56.7%), semejante a lo obtenido en el presente estudio. Sin embargo, Yi *et al.* (2002) obtuvieron 45 y 67% de AI a la descongelación con 0 y 1 hora de tiempo de equilibrio, respectivamente. Por otro lado, el mejor porcentaje de AI fue empleando el diluyente Ley-Leygo, probablemente debido a la adición del Orvus es Paste, ya que este proporciona una mayor protección al espermatozoide, al modificar los componentes de la yema del huevo, actuando específicamente sobre los fosfolípidos y proporcionando protección a las bombas iónicas de la membrana del espermatozoide. En este sentido, las concentracio-

nes intracelulares de calcio serían menores y, por lo tanto, se reduce el estrés osmótico de congelación y descongelación proporcionando una mayor protección al acrosoma (Fraser *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

- Los diluyentes Ley-Leygo y Triladyl® presentaron efectos similares sobre la motilidad individual y la integridad de la membrana plasmática
- El diluyente Triladyl® mejoró la actividad mitocondrial de los espermatozoides a la descongelación.
- Una hora como tiempo de equilibrio incrementó el porcentaje de acrosomas intactos de los espermatozoides a la descongelación, en comparación con 0 h de tiempo de equilibrio.

LITERATURA CITADA

1. **Alcay S, Gokce E, Toker MB, Onder NT, Ustuner B, Uzabacı E, Cavus S. 2016.** Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology* 72: 269-273. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.03.007
2. **Buranaamnuay K, Tummaruk P, Singlor J, Rodriguez Martinez H, Techakumphu M. 2009.** Effects of straw volume and Equex STM® on boar sperm quality after cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 44: 69-73. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00996.x
3. **Corcuera B, Marigorta P, Sagüés A, Saiz-Cidoncha F, Pérez-Gutiérrez J. 2007.** Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa. *Theriogenology* 67: 1150-1157. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.01.002
4. **Didion BA, Braun GD, Duggan MV. 2013.** Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Anim Reprod Sci* 137: 189-196. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.01.001
5. **Fraser L, Jasiewicz E, Kordan W. 2014.** Supplementation of different concentrations of Orvus Es Paste (OEP) to ostrich egg yolk lipoprotein extender improves post-thaw boar semen quality. *Pol J Vet Sci* 17: 225-230. doi: 10.2478/pjvs-2014-0032
6. **Herold F, De Haas K, Colenbrander B, Gerber D. 2006.** Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl® or Andro-Med. *Theriogenology* 66: 1123-30. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.007
7. **Jovičič M, Chmelíková E, Sedmíková M. 2020.** Cryopreservation of boar semen. *Czech J Anim Sci* 65: 115-123. doi: 10.17221/47/2020-CJAS
8. **Khan MH, Nath KC, Deka B, Suresh K, Goswami J, Basumatary R, Champak B. 2013.** Effect of equilibration period on post thaw viability and membrane integrity of boar spermatozoa during conventional method of freezing. *Indian J Anim Sci* 83: 705-09.
9. **Lee KJ, Lee SH, Joo SH, Kim YJ, Yang JW, Lee Y, Hwangbo Y, et al. 2015.** Cryo-ability of boar sperm sorted by percoll containing of antioxidative enzyme. *J Embryo Trans* 30: 121-128. doi: 10.12750/JET.2015.30.3.121
10. **Lee S, Yoo H, Lee Y, Cheong H, Yang B, Kim D, Park C. 2010.** The comparison of Triladyl and LEY for cryosurvival improvement of sperm separated by percoll in miniature pig. *Reprod Dev Biol* 34: 41-46.
11. **Leite TG, do Vale Filho VR, de Arruda RP, De Andrade AF, Emerick LL, Zaffalon FG, Martins JA, et al. 2016.** Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane

- integrity of cryopreserved Gyr bull semen eval by CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 120: 31-38. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.04.005
12. **Malo C, Gil L, Gonzalez N, Cano R, Blas I, 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
 13. **Miguel-Jimenez S, del Alamo MR, Alvarez-Rodriguez M, Hidalgo CO, Pena AI, Muino, R, Rodriguez-Gil JE, et al. 2020.** *In vitro* assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Anim Reprod Sci* 215: 106315. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2020.106315
 14. **Morrier A, Castonguay F, Bailey J. 2002.** Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. *Can J Anim Sci* 82: 347-356. doi: 10.4141/A01-045
 15. **Nagy S, Jansen J, Topper E, Gadella BM. 2003.** A triple-stain flow cytometry method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod* 68: 1828-1835. doi: 10.1095/biolreprod.102.011445
 16. **Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. 2006.** Ensayo: el espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Colomb Cienc Pec* 19: 426-436.
 17. **Palacios A. 1994.** Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Vet México* 25: 207-210.
 18. **Passarelli MS, Pinoti AP, Ravagnania GM, Martinsa MP, Pedrosaa AC, Martinsb SM, Rochac N, et al. 2020.** Effects of different equilibration times at 5 °C on boar sperm cryotolerance. *Anim Reprod Sci* 219: 106547. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106547
 19. **Pezo F, Romero F, Zambrano F, Sánchez RS. 2019.** Preservation of boar semen: an update. *Reprod Domest Anim* 54: 423-434. doi: 10.1111/rda.13389
 20. **Pursel V, Johnson L. 1975.** Freezing of boar spermatozoa fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* 40: 99-102. doi: 10.2527/jas1975.40199x
 21. **Rekha A, Zohara B, Bari FY, Alam MS. 2016.** Comparison of commercial Triladyl extender with a tris-fructoseegg-yolk extender on the quality of frozen semen and pregnancy rate after transcervical AI in Bangladeshi indigenous sheep (*Ovis aries*). *Small Ruminant Res* 134: 39-43. doi: 10.1016/j.smallrumres.-2015.12.007
 22. **Roca J, Hernández M, Carvajal G, Vázquez JM, Martínez EA. 2006.** Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 84: 2692-2699. doi: 10.2527/jas.2006-094
 23. **Salamon S, Maxwell W. 2000.** Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62:77-111. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00155-X
 24. **Saravia F, Wallgren M, Johannsson A, Calvete JJ, Sanz L, Peña F J, Roca J, Rodríguez-Martínez H. 2009.** Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology* 71: 662-675. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.037
 25. **Schäfer J, Waberski D, Jung M, Schulze M. 2017.** Impact of holding and equilibration time on post-thaw quality of shipped boar semen. *Anim Reprod Sci* 187: 109-115. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2017.10.014
 26. **Thurston LM, Watson PF and Holt WV. 1999.** Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. *J Reprod Fertil* 117: 271-280. doi: 10.1530/jrf.0.1170271

27. **Westendorf P, Richter L, Treu H. 1975.** Zur Tiergefrierung Von Ebersperm: Labor und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberg Pailleten Verfahren. Deut Tierarztl Woch 82: 261-267.
28. **Yeste M, Rodríguez-Gil JE, Bonet S. 2017.** Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. Mol Reprod Dev 84: 802-813. doi: 10.1002/mrd.22840
29. **Yi Y, Cheon Y, Park C. 2002.** Effect of N-acetyl-D-glucosamine, and glycerol concentration and equilibration time on acrosomemorphology and motility of frozen-thawed boar sperm. Anim Reprod Sci 69:91-97. doi: 10.1016/S0378-4320(01)00175-0
30. **Yoval-Montemira MF, Castro C, Ake-Villanueva R, Magaña-Monforte JG, Bottini-Luzardo M, Segura-Correa JC. 2020.** Seminal plasma inclusion during boar semen freezing improves post-thaw sperm quality in the tropics. Livestock Res Rural Develop 32 (11). [Internet]. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd32/11/jose.s32183.html>