

Calidad de semen con diferentes crioprotectores en verracos destinados a la inseminación artificial en condiciones de trópico

Wilfrido Navarrete Rios^{1*}; Efrén Estrada Paqui²; Raúl Ulloa Arvizu³; Julio C. Gómez Vargas²; José L. Ponce Covarrubias⁴

¹Maestría en Ciencias de la Producción Animal, Universidad Autónoma de Guerrero

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero

³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

⁴Escuela Superior de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 3, Universidad Autónoma de Guerrero

Correo electrónico: 12500842@uagro.mx

Resumen

El objetivo fue determinar el efecto combinado de crioprotectores sobre los parámetros seminales. Se utilizaron 10 eyaculados de 3 verracos híbridos, en la Región de Tierra Caliente. No se cuenta con una investigación con esta combinación de aditivos para criopreservación de semen porcino. Se tomaron muestras semen de 40 mL (30×10^6 espermatozoides/mL). El diseño experimental fue completamente al azar con mediciones repetidas. Se formaron tres tratamientos: T1: 6 % Glicerol y 1.5 % SDS; T2: 3 % Glicerol, 0.25 % miel de abeja, trehalosa 100 mM y 1.5 % SDS; T3: 1.5 % Glicerol, 0.25 % miel de abeja, trehalosa 100 mM y 1.5 % SDS. Se utilizaron 500×10^6 espermatozoides en pajillas de 0.5 mL, posteriormente se congelaron y almacenaron en termo criogénico. Se descongelaron dos pajillas por tratamiento a 38° C por agitación durante 20 s y se diluyeron con VITASEM®. Las variables seminales evaluadas fueron movilidad y viabilidad con tinción de eosina-nigrosina a los 0 y 15 minutos posdescongelación. El porcentaje de movilidad espermática a la descongelación para los tratamientos 1, 2 y 3 fueron 35 ± 2.2 , 37 ± 2.1 ; 33 ± 1.5 , 39 ± 1.2 ; 36 ± 1.6 , 37 ± 1.5 y el porcentaje de viabilidad fue 54 ± 1.1 , 54 ± 0.7 ; 53 ± 2.4 , 53 ± 2.3 ; 51 ± 2.9 , 55 ± 2.5 a los 0 y 15 minutos respectivamente, no se encontraron diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$). En conclusión, las diferentes combinaciones de crioprotectores fueron efectivos manteniendo la calidad del semen, sin embargo, la viabilidad espermática fue diferente entre verracos destinados a la inseminación artificial en el trópico de Guerrero.

Palabras clave: trehalosa, miel de abeja, verraco.

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. De ellas, el 98 % se llevan a cabo con semen diluido conservado a 17 °C durante 1 - 5 d (Roca *et al.*, 2011). 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 diluentes de congelación repercutiendo positivamente en la mejor calidad espermática después de la descongelación que asociado a las técnicas de inseminación como la post-cervical han permitido alcanzar excelente fertilidad y prolificidad empleando solo dosis espermáticas de 500 a 1 000x10⁹ de espermatozoides (Flowers, 2002). Conjuntamente con una buena detección de estro de la hembra puede ofrecer resultados similares a los obtenidos con semen diluido a 17 °C, con tasas de parto superiores al 80 % (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 debe ser de no más del 6.5 % pues resulta tóxico para el espermatozoide ya que afecta 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 no permeables dentro de estos, los azúcares 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 (Cerrutti *et al.*, 2000). La trehalosa es un disacárido no reductor. Además, 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 (Jafaroghli *et al.*, 2011). Athurupana *et al.* (2015) mencionan que al utilizar 100 mM de trehalosa para la criopreservación del espermatozoide de verraco tuvieron mejores resultados de movilidad, viabilidad e integridad del acrosoma, esto disminuyendo la concentración de glicerol al 3 y 1.5 %. 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. En este contexto, Zhang *et al.* (2020) reportaron que la utilización de trehalosa en combinación con glicerol mejora la calidad del semen criopreservado. También, a la trehalosa se le atribuye un efecto a nivel osmótico sobre la célula

espermática muy parecido al glicerol y puede mejorar la calidad del semen criopreservado (Athurupana *et al.*, 2015).

Así mismo, la trehalosa participa en la glucólisis la cual es la principal ruta por medio de la cual el espermatozoide produce energía para su desplazamiento 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 fuente energética para el espermatozoide de verraco es la miel de abeja deshidratada con un porcentaje de inclusión del 0.25 %, la cual tiene efecto sobre el gasto energético a nivel glucolítico y por tanto mejora los parámetros 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 combinado de crioprotectores sobre los estimadores seminales.

Metodología

Se utilizaron tres verracos de línea genética híbrida del centro de transferencia genética (CTG) 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, 3.1 Mcal/ EM y 0.6 % de lisina. La colección de semen se realizó por la técnica de la mano enguantada, una vez por semana alternando cada verraco (Estrada *et al.*, 2014). 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 diluyente de mediana conservación VITASEM® y el almacenamiento en cámara de temperatura controlada de 17 °C. Se tomaron muestras de semen completo de 40 mL (30×10^6 espermatozoides/ mL) después de la colección y se diluyó 1:3 (v/v), 40 mL semen y 120 mL diluyente. 24 horas 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 minutos, 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 depositando 1990 µL solución

espermática y 10 μ L de semen reconstituido. Se agregó el LEY restante al semen reconstituido. Se pasó a refrigeración durante 120 minutos (tasa de enfriamiento de 0.1 °C/ minuto) hasta 5 °C.

El diseño experimental fue completamente al azar con mediciones repetidas y se formaron los tratamientos: T1 testigo: Glicerol 6 % (648 μ L) y lauril sulfato de sodio (SDS) 1.5 % (10 mg); T2: Glicerol 3 % (324 μ L), miel de abeja deshidratada (MAD) 0.25 % (25 mg), trehalosa 100 mM (342 mg) y SDS 1.5 % (10 mg); T3: Glicerol 1.5 % (162 μ L), MAD 0.25 % (25 mg), trehalosa 100 mM (342 mg) y SDS 1.5 % (10 mg) y se procedió al llenado de pajillas de 0.5 mL con 500×10^6 de espermatozoides y fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido durante 10 minutos y depositadas en termo criogénico para su almacenamiento.

Se descongelaron dos pajillas por tratamiento a 38 °C por agitación durante 20 segundos y posteriormente el vaciamiento de la pajilla en diluyente VITASEM® 1:3 (v/v) en tubo graduado y se mantuvo en incubación durante 15 minutos a 38 °C. Las variables seminales evaluadas fueron movilidad por microscopia óptica directa a 10x y viabilidad con tinción de eosina-nigrosina a los 0 y 15 minutos posdescongelación por medio de microscopio óptico efectuando un conteo de 200 espermatozoides, realizando dos replicas para las dos variables. El análisis estadístico se llevó a cabo por comparación de medias y análisis de varianza (ANOVA) entre tratamientos y entre verracos con una significancia de $P < 0.05$, en el paquete estadístico SPSS ver. 27.

Resultados

El porcentaje de movilidad espermática a la descongelación para los tratamientos 1, 2 y 3 fueron 35 ± 2.2 , 37 ± 2.1 ; 33 ± 1.5 , 39 ± 1.2 ; 36 ± 1.6 , 37 ± 1.5 y el porcentaje de viabilidad fue 54 ± 1.1 , 54 ± 0.7 ; 53 ± 2.4 , 53 ± 2.3 ; 51 ± 2.9 , 55 ± 2.5 a los 0 y 15 minutos respectivamente, no se encontraron diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$, Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de la combinación glicerol, miel de abeja deshidratada y trehalosa sobre la movilidad y viabilidad del espermatozoide porcino (media, error a la media, $n = 10$).

Tratamiento	MD	MI	VD	VI
	%	%	%	%
1	35 ± 2.2^a	37 ± 2.1^a	54 ± 1.1^a	54 ± 0.7^a
2	33 ± 1.5^a	39 ± 1.2^a	53 ± 2.4^a	53 ± 2.3^a
3	36 ± 1.6^a	37 ± 1.5^a	51 ± 2.9^a	55 ± 2.5^a
Valor P	0.44	0.52	0.26	0.75

1: Convencional testigo; 2: Glicerol 3 %, MAD 0.25 %, trehalosa 100 mM y SDS 1.5 %; 3: Glicerol 1.5 %, MAD 0.25 %, trehalosa 100 mM y SDS 1.5 %. MD: Movilidad/ descongelación, MI: Movilidad incubación $37^\circ\text{C}/15\text{ min}$, VD: Viabilidad/ descongelación, VI: Viabilidad incubación $37^\circ\text{C}/15\text{ min}$.

Literales (a, b) en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

En cuanto al porcentaje de movilidad espermática a la descongelación entre verracos fueron 34 ± 1.7 , 38 ± 1.1 ; 35 ± 2.4 , 38 ± 2.0 ; 34 ± 1.4 , 35 ± 1.4 respectivamente, no observando diferencias a 0 y 15 minutos ($P > 0.05$, Cuadro 2). En el caso del porcentaje de viabilidad se obtuvieron los porcentajes de 49 ± 1.7 , 49 ± 1.6 ; 51 ± 1.6 , 53 ± 1.5 ; 56 ± 2.3 , 58 ± 2.1 , en el que se observó diferencias significativas en la viabilidad a 15 minutos para el verraco 3 comparada con los verracos 1 y 2 ($P < 0.05$, Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto del verraco sobre la movilidad y viabilidad del espermatozoide porcino (media, error a la media, n= 10).

Verraco	MD	MI	VD	VI
	%	%	%	%
1	34±1.7 ^a	38±1.1 ^a	49±1.7 ^a	49±1.6 ^a
2	35±2.4 ^a	38±2.0 ^a	51±1.6 ^a	53±1.5 ^a
3	34±1.4 ^a	35±1.4 ^a	56±2.3 ^a	58±2.1 ^b
Valor P	0.94	0.26	0.09	0.01

1: Convencional testigo; 2: Glicerol 3 %, MAD 0.25 %, trehalosa 100 mM y SDS 1.5 %; 3: Glicerol 1.5 %, MAD 0.25 %, trehalosa 100 mM y SDS 1.5 %. MD: Movilidad/ descongelación, MI: Movilidad incubación 37 °C/ 15 min, VD: Viabilidad/ descongelación, VI: Viabilidad incubación 37 °C/ 15 min.

Literales (a, b) en la misma columna muestran diferencias significativas (P < 0.05).

Discusión

La combinación de glicerol a diferentes niveles con miel de abeja deshidratada y trehalosa mantuvieron los parámetros de calidad del semen de verraco a la criopreservación de la misma forma que con el protocolo convencional. Así mismo, se ha descrito que la adición de azúcares al medio de congelación tiene efectos positivos sobre la integridad de la membrana del espermatozoide después de la descongelación, ya que estas moléculas proveen energía para el espermatozoide durante la criopreservación, mantiene la presión osmótica evitando la deshidratación celular (Malo *et al.*, 2010). En el presente estudio no se mostró ninguna diferencia en los parámetros de calidad del espermatozoide de verraco criopreservado en respuesta a la combinación de glicerol con miel de abeja deshidratada y trehalosa, mantuvieron el mismo valor de movilidad e integridad de la membrana plasmática (viabilidad). Estos resultados fueron superiores a los encontrados en este estudio para estos parámetros en combinación de glicerol, miel de abeja deshidratada y trehalosa con una movilidad a 0 y 15 minutos de 35±2.2, 37±2.1; 33±1.5, 39±1.2; 36±1.6, 37±1.5 y viabilidad del 54±1.1, 54±0.7; 53±2.4, 53±2.3;

51±2.9, 55±2.5 respectivamente. Al comparar estos resultados con los reportados Jhamb et al. (2021) utilizando diferentes niveles de trehalosa en el medio de congelación encontrando los mejores resultados con 50 mM en semen criopreservado de equino el cual obtuvo una movilidad del 54 % y viabilidad del 60 %. Por su parte, Domínguez et al. (2023) al utilizar diferentes crioprotectores demostraron que con 375 mM de trehalosa se obtuvieron los mejores resultados con una movilidad total y viabilidad de 22.21 y 69 % respectivamente 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 tuvieron mejores resultados de movilidad total de 36 % y viabilidad del 40 % en semen criopreservado de verraco. Así mismo, Athurupana et al. (2015) mencionan que al utilizar 100 mM de trehalosa para la criopreservación del espermatozoide de verraco tuvieron mejores resultados de movilidad, viabilidad e integridad del acrosoma, esto disminuyendo la concentración de glicerol al 3 y 1.5 %. Mendoza-Viveros et al. (2022) al utilizar 300 mM de trehalosa y un 10 % de liposomas en el medio de congelación reportaron una motilidad progresiva de 18.92 % y 28.22 % de viabilidad en semen criopreservado de verraco.

Se ha descrito que la suplementación del medio de congelación con una concentración de 10 % de miel de abeja mejoró la movilidad a la descongelación teniendo 52.82 %, lo que optimizó la calidad del semen criopreservado de humano (Fakhrildin y Alsaadi, 2014). De manera similar, Yimer et al. (2015) mencionan que la adición de 2.5 % de miel de abeja al medio Tris durante la congelación de semen de toro se mejoró la movilidad y viabilidad del espermatozoide a la descongelación obteniendo 44.4±1.0 y 43.5±1.5 % respectivamente. Por su parte, Chung et al. (2019) al probar diferentes niveles de inclusión de miel de abeja en el medio de enfriamiento y congelación para semen de toro, encontró los mejores resultados con el 1 % con movilidad total y viabilidad de 61 % y 65 % respectivamente. 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 movilidad total de 17.87 % en el semen criopreservado de verraco.

En el presente estudio cabe mencionar que se observó diferencia significativa entre verracos en la variable de viabilidad espermática a 15 minutos de incubación, observando que el verraco 3 fue mejor en viabilidad en respuesta al proceso de criopreservación, situación que ha sido documentado por

Estrada et al. (2014) quienes indican que existen diferencias individuales entre verracos clasificándolos como buenos y malos congeladores.

Conclusiones

Las diferentes combinaciones de crioprotectores fueron efectivos manteniendo la calidad del semen a la criopreservación. Por otro lado, la asociación de glicerol, trehalosa y miel de abeja deshidratada puede ser una nueva opción para la criopreservación del espermatozoide porcino. Sin embargo, son necesarios otros estudios que demuestren su potencial de fertilización del semen criopreservado por medio de la inseminación artificial en la cerda, con la finalidad de determinar su capacidad fecundante y parámetros productivos en granjas bajo 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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>

Cerrutti, P., Segovia de Huerdo, M., Galvagno, M., Schebor, C., y del Pilar Buera, M. (2000). Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(4), 575-580. doi: [10.1007/s002530000428](https://doi.org/10.1007/s002530000428).

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](https://doi.org/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., Rodríguez-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](https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00144.x)

Fakhrildin, M. M., & Alsaadi, R. A. (2014). Honey Supplementation to Semen-Freezing Medium Improves Human Sperm Parameters Post-Thawing. *Journal of Family y Reproductive Health*, 8(1), 27 - 31.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4064758/>

Flowers, W. L. (2002). Increasing fertilization rate of boars: influence of number and quality of spermatozoa inseminated. *Journal of Animal Science*, (80), 47-53.

<https://doi.org/10.2527/animalsci2002.0021881200800ES10008x>

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](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00152-4).

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>

Jhamb, D., Sharma, S., Talluri, T. R., Nirwan, S. S., Juneja, R., Kumar, V., Tanwar, A., Pargi, K., Deepak, Nandan, D., Kumar, P., Gaur, M., and Gautam, L. K. (2021). Effect of Trehalose Supplementation to Semen Extender on Quality of Cryopreserved Stallion Semen. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 10(01): 1342-1350. doi:[10.20546/ijcmas.2021.1001.160](https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1001.160)

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>

[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](https://doi.org/10.1017/S0967199422000442)

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](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01828.x)

Silva, C. G., Cunha, E. R., Blume, G. R., Malaquias, J. V., Báó, 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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.05.003)

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.

Zhang, T. Y., Tan, P. C., Xie, Y., Zhang, X. J., Zhang, P. Q., Gao, Y. M., Zhou, S. B., and Li, Q. F. (2020). The combination of trehalose and glycerol: an effective and non-toxic recipe for cryopreservation of human adipose-derived stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, (11), 460. doi: [10.1186/s13287-020-01969-0](https://doi.org/10.1186/s13287-020-01969-0)