



Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2023; 13:1-13. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2023.23>
Artículo Original. Recibido: 31/05/2022. Aceptado:21/10/2023. Publicado: 30/12/2023. Clave: e2022-39.
<https://www.youtube.com/watch?v=n-SwMBul4Hg>

Efecto de diferentes crioprotectores sobre la criopreservación del semen de cerdo Pelón Mexicano



Effect of different cryoprotectants on the criopreservation of Mexican Hairless boar semen

Domínguez-Rebolledo Álvaro¹ ID, Herrera-Herrera Jorge² ID, Ramón-Ugalde Julio² ID, Aguilar-Urquizo Edgar² ID, Loeza-Concha Henry³ ID*, Sanginés-García José² ID

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Mocochoá. Km. 25 Antigua carretera Mérida-Motul. C.P. 97454. Mocochoá, Yucatán. ²Instituto Tecnológico de Conkal, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Antigua Carretera Mérida-Motul km 16.3, C.P. 97345, Conkal, Yucatán. México. ³Colegio de Postgraduados, Campus Campeche. Carretera Haltunchén-Edzná. km 17.5, C.P. 24450; Sihochac, Champotón, Campeche. *Autor de correspondencia: Loeza-Concha Henry. Programa de Maestría en Ciencias Bioprospección y Sustentabilidad Agrícola en el Trópico, Colegio de Postgraduados Campus Campeche, Carretera, Haltunchén-Edzná; C.P. 24450; Champotón, Campeche, México. E-mail: dominguez.alvaro@inifap.gob.mx, jorgeherrera_1990@hotmail.com, julio.ramon@itconkal.edu.mx, edgar.aguilar@itconkal.edu.mx, loeza.jesus@colpos.mx, roberto.sangines@itconkal.edu.mx

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto crioprotector del tipo de azúcar en el diluyente sobre la criopreservación del semen de cerdo pelón mexicano. Se obtuvieron 30 eyaculados de cinco verracos sexualmente maduros, los cuales fueron mezclados, diluidos y congelados en cuatro diferentes crioprotectores: glucosa (T1), lactosa (T2), fructosa (T3) y trehalosa (T4). La descongelación se realizó a 37 °C y se evaluaron los parámetros de motilidad (sistema CASA), viabilidad espermática (IP), actividad mitocondrial (JC-1), integridad del acrosoma (FITC-PSA) y de la membrana plasmática de la cola (Host). La Motilidad total (MT) y la velocidad de la trayectoria media (VAP) fueron superiores ($P < 0.02$) en T1 y T2, mientras que la velocidad curvilínea (VCL) fue mayor ($P < 0.05$) en T1. Las otras variables asociadas a la motilidad fueron similares ($P > 0.05$) al igual que la viabilidad y la membrana espermática de la cola. La actividad mitocondrial fue mayor ($P < 0.005$) en T2 y T4. La integridad del acrosoma fue mayor ($P < 0.001$) en T2 y T4. En conclusión, el diluyente con lactosa es el más adecuado para la criopreservación del semen de cerdo pelón mexicano.

Palabras clave: criopreservación, semen, azúcares, cerdo pelón mexicano.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the cryoprotective effect of four types of sugars on the cryopreservation of Mexican hairless boar semen. Twenty ejaculates were collected from five sexually mature boars, which were mixed, diluted and cryopreserved in four different cryoprotective extenders: T1: glucose, T2: lactose, T3: fructose and T4: trehalose. The straws were thawed at 37 °C and motility parameters were evaluated with the CASA system, sperm viability (IP), mitochondrial activity (JC-1), acrosome integrity (FITC-PSA) and plasma membrane integrity in the tail (Host). Total motility (MT) and mean trajectory velocity (VAP) were superior ($P < 0.02$) in T1 and T2, while the curvilinear velocity (VCL) was higher ($P < 0.05$) in T1. The other variables associated with motility were similar ($P > 0.05$) as well as the viability and sperm membrane of the tail. Mitochondrial activity was higher ($P < 0.005$) in T2 and T4. Acrosome integrity was higher ($P < 0.001$) in T2 and T4. In conclusion, the diluent with lactose is the most suitable for the cryopreservation of Mexican hairless boar semen.



were higher ($P < 0.02$) in T1 and T2, while the curvilinear velocity (VCL) was higher ($P < 0.05$) in T1, the other variables associated with motility were similar ($P > 0.10$), as well as sperm viability and Host. Mitochondrial activity was higher ($P < 0.005$) in T2 and T4. The integrity of the acrosome was greater ($P < 0.001$) in T2 and T4. In conclusion, lactose proved to be the best extender for the cryopreservation of Mexican hairless boar semen.

Keywords: cryopreservation, semen, sugars, Mexican hairless pigs.

INTRODUCCIÓN

El Cerdo Pelón Mexicano (CPM) es descendiente de cerdos de tipo mediterráneo. En años recientes, la población de este genotipo se ha reducido drásticamente, y ha estado sujeta a un proceso de erosión genética debido al cruzamiento indiscriminado con razas de genotipo magro. Por otra parte, el elevado contenido de grasa intramuscular y el espesor de la grasa dorsal son importantes para el curado de los productos cárnicos, ya que esta característica permite una lenta deshidratación durante el proceso (Kucha *et al.*, 2023). Las razas locales reflejan una identidad cultural e histórica. Por otra parte, a mayor exposición de una población a un desafío ambiental, es mayor la probabilidad del desarrollo de caracteres genéticos adaptativos específicos, así, la preservación de los recursos zoogenéticos en riesgo puede realizarse a través de la criopreservación de gametos de aquellos animales con características fenotípicas y genotípicas deseables (Blackburn *et al.*, 2023); esta técnica, asegura la disponibilidad a largo plazo de los recursos genéticos (Boes *et al.*, 2023) y su éxito depende de la comprensión de los factores que influyen en la sobrevivencia de los espermatozoides durante los procesos de congelación/descongelación (C/D) (Contreras *et al.*, 2023). Asimismo, Hensel *et al.* (2023) sugieren que el verraco, la edad, raza y época del año son factores que influye en la variabilidad del eyaculado y en la sobrevivencia a la criopreservación. Además, tanto el almacenamiento, como la C/D causa estrés físico y químico a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide (Socol *et al.*, 2015).

En este sentido, la tasa de cambio en la temperatura debe ser tal, que permita el movimiento del agua y los crioprotectores sin la formación de hielo intracelular o daños irreversibles en la membrana (Ozimic *et al.*, 2023); el daño celular durante la congelación podría estar relacionado con la composición lipídica de la membrana plasmática, el estrés oxidativo y la formación de radicales libres; la velocidad de enfriamiento controlada mejora la calidad espermática a la descongelación sin que se observe un efecto sobre la peroxidación de los lípidos (Baishya *et al.*, 2014). Así, el estrés osmótico induce daños en la membrana plasmática y alteración en el metabolismo del espermatozoide (Jin *et al.*, 2022). Este daño, está relacionado con la formación de cristales de hielo en el interior de la célula. El espermatozoide porcino ostenta una presión osmótica de 290-300 mOsm/l y es capaz de tolerar desde 240 hasta 380 mOsm/l (Izquierdo *et al.*, 2016); sin embargo, cuando se congela con el diluyente F5 con osmolaridades que van de 420 a 580 mOsm, se ha observado mayor motilidad progresiva, acrosoma intacto y espermatozoides viables (Zeng *et al.*, 2001).



Durante los procesos de congelación, se produce la lisis de las membranas debido a la formación de cristales de hielo; que afectan negativamente la supervivencia y capacidad fecundante de las células espermáticas y, en consecuencia, disminuye la fertilidad y prolificidad (Sieme *et al.*, 2016). Por lo tanto, los agentes crioprotectores de baja toxicidad celular, tienen la finalidad de reducir los daños en las membranas durante el proceso de congelación, los cuales de acuerdo con su capacidad para difundirse a través de la membrana citoplasmática se pueden clasificar en: penetrantes, como; (el glicerol y dimetilsulfoxido (DMSO), y no penetrantes, como; la lactosa y trehalosa (Silva *et al.*, 2015; Golshahi *et al.*, 2018). En este sentido los estudios sobre la criopreservación de semen de berracos datan desde 1975, y desde entonces se han reportado el uso de diferentes componentes en los diluyentes para la congelación de semen porcino como; la yema de huevo, el glicerol, el detergente sintético Orvus Es Paste (Pursel & Johnson, 1975) entre otros.

No obstante, se han evaluado diversos azúcares como crioprotectores no penetrantes, entre los cuales se incluyen: glucosa, fructosa, lactosa y trehalosa (De mercado *et al.*, 2010; Athurupana *et al.*, 2015; Cantanhêde *et al.*, 2018; Pezo *et al.*, 2020; Kamal *et al.*, 2023) donde, los que han dado mejores resultados en cerdos comerciales post-descongelación son la lactosa y la trehalosa, sin embargo, se desconocen los efectos de diferentes diluyentes sobre la calidad seminal del cerdo pelón mexicano. Por lo que, el objetivo fue evaluar diferentes azúcares en el diluyente de congelación para semen de cerdo pelón mexicano y su efecto sobre la calidad seminal a la descongelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó bajo el reconocimiento de la norma oficial mexicana NOM-027-ZOO-1995, proceso zoonosanitario del semen de animales domésticos.

Localización

El trabajo se desarrolló en el área de producción e investigación agrícola y pecuaria del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, México (21°05' N y 89°32' O), que se encuentra a una altitud de 7 msnm, con clima tipo AW0, con precipitación de 900 mm anuales y temperatura promedio de 29 °C.

Animales utilizados y alimentación

Se utilizaron cinco verracos sexualmente maduros de genotipo pelón mexicano de una edad promedio de 1.5 años, los cuales fueron alojados en corraletas individuales de 8 m², en un sistema de cama profunda, utilizando como sustrato la cascarilla de arroz provistos de bebedero tipo chupón y comedero. Durante la fase experimental se les proporcionó el alimento en función de su peso (1.5% de su peso), dividido en dos



porciones a las 8:00 y 16:00 h; la cual se formuló con base en los requerimientos nutricionales del National Research Council (NRC, 2012).

Manejo de los animales

Los verracos se sometieron a un periodo de entrenamiento para la recolección de semen dos veces por semana durante ocho semanas, para esto, se utilizó un maniquí impregnado con la orina de cerdas en celo; las sesiones de entrenamiento tuvieron una duración de cinco minutos. El orden de los verracos para la monta del maniquí fue aleatorio, con la finalidad de eliminar posibles efectos olfativos que pudiesen influir durante el adiestramiento y en las extracciones seminales.

Obtención y manejo de los eyaculados

Se obtuvieron un total de 30 eyaculados de 5 verracos (6 eyaculados/verraco), a los cuales se les eliminó la fracción de gel (tapioca) de la líquida. Posteriormente, la fracción rica en espermatozoides (líquida) fue transportada al laboratorio de tecnología de semen del Instituto en un termo (magapor®) a una temperatura de 37 °C y se evaluó el volumen, la motilidad y la concentración espermática, espermatozoides vivos y anomalías utilizando los procedimientos estándar de laboratorio. Para las pruebas de congelación, solamente se utilizaron muestras de semen de eyaculados que tuviesen una concentración espermática $\geq 200 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, motilidad $\geq 75\%$ y espermatozoides viables $\geq 80\%$. y menos del 15% de anomalías espermáticas. De la fracción rica del eyaculado se obtuvieron 6 mL los cuales se diluyeron en la solución BTS (Beltsville Thawing Solution) 1:1 (vol/vol) (Pursel & Johnson, 1975), la cual se preparó con: 205 mM de glucosa, 20.39 mM de NaCl, 5.4 mM KCl, 15.01 mM de NaHCO₃, 3.35 mM EDTA y 200 mg sulfato de kanamicina L⁻¹. El semen diluido fue transferido a tubos Eppendorf® de plástico con capacidad de 15 mL.

La criopreservación se realizó mediante el protocolo reportado por De Mercado *et al.* (2010), que consistió en centrifugar el semen diluido en BTS a 2400 x g durante 3 min (BIOHAZARD, Cole-Parmer®), eliminando el sobrenadante por aspiración (Pedrosa *et al.*, 2021), y suspendiendo nuevamente el precipitado (pellet) con BTS. Posteriormente, todos los eyaculados se mezclaron (pool) y se les adicionó el diluyente de congelación correspondiente a cada tratamiento (Tabla 1), hasta llegar a una concentración de 1.5×10^9 células mL⁻¹. Los tratamientos estuvieron definidos por el tipo de azúcar utilizado como crioprotector.

Una vez obtenida la concentración espermática deseada en los diferentes diluyentes, las muestras se enfriaron a 5 °C durante 120 min (etapa de estabilización). Posteriormente se realizó una segunda dilución, utilizando el diluyente correspondiente a cada tratamiento, el cual fue adicionado con Orvus Es Paste® al 1.5% y glicerol al 6 ó 9%; la concentración final fue 1×10^9 células mL⁻¹. Después de la segunda dilución, el semen



fue empacado en pajillas de 0.5 mL de PVC-francés (pajuelas Minitüb, Tiefenbach®, Alemania). Al finalizar el empajillado (3 pajillas/tratamiento), éstas se sometieron a vapores de nitrógeno durante 20 min y finalmente se sumergieron en el nitrógeno líquido a -196°C , donde permanecieron almacenadas hasta el momento de la descongelación para su análisis. El procedimiento de descongelación de las pajillas fue mediante la inmersión de las pajillas en agua a 37°C durante 20 s.

Tabla 1. Composición de los diluyentes de congelación I y II (mM)

Componentes	Diluyente de congelación I			
	Glucosa T 1	Lactosa T2	Fructosa T3	Trehalosa T4
Tris (mM)	111			
Glucosa (mM)	185			
β -Lactosa (mM)		310		
Fructosa (mM)			408.1	
Trehalosa (mM)				375
Ácido cítrico (mM)	31.4			
NaHCO_3 (mM)			1.5	
Cisteína (mM)			1.15	
Sulfato de Kanamicina $\mu\text{g/ml}$				100
Yema de huevo (%)	20	20	22.5	20
Osmolaridad (mOsm/kg)	293	367	436	390

Componentes	Diluyente de congelación II			
	Glucosa T 1	Lactosa T2	Fructosa T3	Trehalosa T4
Orvus es paste (%)	1.5	1.5	1.5	1.5
Glicerol (%)	9	9	6	9
Osmolalidad (mOsm/kg)	1950	2100	1596	1540

Variables evaluadas

Se descongelaron 3 pajillas por tratamiento y la calidad del semen se determinó mediante la evaluación de los parámetros de motilidad espermática, viabilidad (integridad de la membrana plasmática), actividad mitocondrial, integridad del acrosoma y la integridad de la membrana plasmática de la cola.

Para la evaluación de la motilidad se utilizó el sistema computarizado de análisis espermático AI Station (SPERM.TECH®, Valencia, España); para esto, se colocaron 5 μL del semen diluido a una concentración de $\sim 30 \times 10^6$ espermatozoides mL^{-1} en una cámara de recuento Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel), insertada en una platina precalentada a 37°C , utilizando un microscopio de contraste de fase negativo UOB modelo UB200i de 10x y con una cámara digital (Basler Ace ACA1300-200UC). Las variables de motilidad evaluadas fueron: espermatozoides móviles totales (MT, %); motilidad progresiva (MP, %); velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$); velocidad rectilínea (VSL,



$\mu\text{m/s}$); velocidad de la trayectoria media (VAP, $\mu\text{m/s}$); linealidad (LIN, %); rectitud (STR, %); oscilación (WOB, %); amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH, μm) y; BCF: frecuencia del batido de la cola (Hz).

La calidad de los eyaculados se evaluó considerando la viabilidad, la actividad mitocondrial, la integridad del acrosoma y la integridad de la membrana plasmática de la cola. Se utilizó el procedimiento de triple fluorescencia, descrito por [Ratchamak et al. \(2019\)](#) para espermatozoides de verraco. Para esto, las muestras de semen descongeladas previamente de cada tratamiento se diluyeron en una solución de BTS (1:1, v/v) y se incubaron en la oscuridad a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10^{-1} min, utilizando los siguientes fluorocromos: PI (Live/Dead kit L-7011[®], Invitrogen), el cual tiñe de rojo el ADN de los espermatozoides muertos; para la actividad mitocondrial se utilizó la tinción JC-1 (Molecular Probes T-3168[®], Invitrogen), donde la pieza intermedia del flagelo de los espermatozoides con actividad mitocondrial se tiñen de color naranja; para evaluar la integridad del acrosoma se utilizó la tinción de FITC-PSA[®] (L-0770, Sigma), donde los espermatozoides con daño en el acrosoma se tiñen de color verde y; para evaluar la integridad de la membrana plasmática de la cola se utilizó una solución hipo-osmótica (150 mOsm/L), considerado positivo el espermatozoide que presente cualquier grado de torsión helicoidal del flagelo ([Vázquez et al., 1997](#)). Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus CX41, Tokio, Japón).

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 tratamientos, los cuales se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) y para determinar las diferencias estadísticas entre tratamientos se utilizó la prueba de Tukey a $P \leq 0.05$.

Modelo

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

EJEMPLO:

Donde:

$Y_{ij} = 90$ (la viabilidad del semen para la primera muestra con Tratamiento A).

μ = la media general de la viabilidad del semen de todas las muestras (supongamos que es 85% después de calcularlo).

T_i = el efecto del Tratamiento A (la diferencia entre la media del Tratamiento A y la media general).

ϵ_{ij} = el error residual (la diferencia entre la viabilidad observada del semen y lo que el modelo predice, es decir, la diferencia entre 90% y la suma de μ y T_i).



RESULTADOS

La MT y la VAP fueron mayores ($P < 0.05$) en los diluyentes de congelación que contenían glucosa o lactosa, con respecto a los otros dos azúcares utilizados; mientras que la VCL fue mayor ($P < 0.05$) en el diluyente que contenía glucosa en el diluyente de congelación I. Los otros parámetros de motilidad evaluados a través del sistema CASA, no obtuvieron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) en todos los azúcares (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de motilidad espermática obtenidos con el sistema CASA en semen de cerdo pelón mexicano post-descongelación

Parámetro	Tratamientos				EE	Valor de P
	T1	T2	T3	T4		
MT (%)	33.84 ^a	32.82 ^a	21.70 ^b	22.21 ^b	2.16	0.02
MP (%)	7.91	12.15	8.52	4.77	0.86	$P > 0.10$
VAP ($\mu\text{m}/\text{sg}$)	41.73 ^a	37.19 ^a	32.51 ^b	34.16 ^b	1.63	0.02
VCL ($\mu\text{m}/\text{sg}$)	71.63 ^a	61.49 ^b	56.23 ^b	58.30 ^b	2.73	0.02
VSL ($\mu\text{m}/\text{sg}$)	24.70	26.12	22.35	21.67	1.26	$P > 0.10$
LIN (%)	37.02	41.30	38.62	36.63	1.22	$P > 0.10$
STR (%)	59.10	65.70	62.31	58.74	1.59	$P > 0.10$
WOB (%)	59.48	60.51	59.46	59.60	1.19	$P > 0.10$
ALH (μm)	2.74	2.50	2.25	2.63	0.08	$P > 0.10$
BCF (Hz)	7.40	6.01	7.33	4.71	0.37	$P > 0.10$

EE: Error estándar de la media. Letras diferentes entre columnas implica diferencias ($P < 0.05$). Medidas realizadas con el sistema CASA (AI Station). MT: motilidad total; MP: motilidad progresiva; VSL: velocidad en línea recta; VCL: velocidad curvilínea; VAP: velocidad promedio de la trayectoria; LIN: linealidad; WOB: oscilación; STR: rectitud; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de batido de la cola. T1, glucosa; T2, lactosa; T3, fructosa; T4, trehalosa.

El porcentaje de espermatozoides viables y Host, fue similar ($P > 0.05$) entre tratamientos. La integridad del acrosoma y la actividad mitocondrial de los espermatozoides post-descongelación fue menor ($P < 0.01$) cuando se utilizó glucosa como crioprotector y el mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal se observó cuando se utilizó lactosa o trehalosa como crioprotector; mientras que la mayor actividad mitocondrial se observó cuando se utilizó lactosa (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Hay que considerar que, bajo las condiciones en que se realizó el presente trabajo (trópico, raza, alimentación, diluyente, crioprotector, curva de refrigeración, etc.), las respuestas no necesariamente son repetibles, sin embargo, sirven para constatar la eficiencia de las mismas en contraste con los diluyentes propuestos. En este sentido, los métodos clásicos de laboratorio en la evaluación seminal son insuficientes para predecir la fertilidad, de estos, la motilidad espermática es considerada como uno de los parámetros más utilizados para determinar la calidad del semen fresco o conservado (Zhang *et al.*, 2021).



Tabla 3. Porcentaje de viabilidad, actividad mitocondrial, integridad del acrosoma e integridad de la membrana plasmática de la cola de los espermatozoides post-descongelación

Variables (%)	Tratamientos				EE	Valor de P
	T1	T2	T3	T4		
VIAB	75.63	79.27	68.81	69.00	1.48	P > 0.10
AM	42.27 ^b	67.09 ^a	40.54 ^b	58.75 ^{ab}	3.42	0.005
AI	64.54 ^c	84.36 ^a	75.90 ^b	84.25 ^a	1.88	0.001
HOST	7.10	6.50	5.90	8	0.76	P > 0.10

EE: Error estándar de la media. Literales diferentes entre tratamientos, implica diferencias significativas (P < 0.05). VIAB: espermatozoides vivos; AM: espermatozoides con actividad mitocondrial; AI: espermatozoides con acrosoma intacto; HOST: integridad de la membrana plasmática de la cola. T1, glucosa; T2, lactosa; T3, fructosa; T4, trehalosa.

Posterior a la descongelación, tanto la motilidad como la viabilidad espermática disminuyen significativamente, independientemente del procedimiento de congelación utilizado ([Baishya et al., 2014](#)); así mismo, esta disminución, está asociada a la calidad inicial del eyaculado ([Jovičić et al., 2020](#)) y al tiempo de incubación post descongelado ([Alkmin et al., 2014](#)). En el presente trabajo, la reducción en la calidad espermática post-descongelación se observó en todos los tratamientos, independientemente del crioprotector utilizado y la pérdida de motilidad fue mayor cuando se utilizó fructosa o trehalosa; contrario a lo observado por [Malo et al. \(2010\)](#) en donde la trehalosa mostró tener mayor capacidad en la crioprotección del semen porcino con mayor tasa de sobrevivencia y capacidad de fertilización *in vitro* respecto a la glucosa y lactosa. Asimismo, [Athurupana et al. \(2015\)](#) observaron altas tasas de motilidad e integridad de la membrana plasmática en muestras espermáticas de verracos de la raza Berkshire que fueron congeladas con trehalosa. De igual manera, [Cantanhêde et al. \(2018\)](#) notaron que la adición de la fructosa en el diluyente proporciona mayor funcionalidad de la membrana de los espermatozoides a la post-descongelación. Por otra parte, se ha demostrado que la composición de los diluyentes afecta la función espermática durante el proceso de criopreservación y el tipo de azúcar utilizado y su concentración son importantes para la sobrevivencia de los espermatozoides ([Chanapiwat et al., 2012](#); [De Mercado et al., 2010](#)). En el presente trabajo, se observaron diferencias significativas en las variables de calidad en el semen congelado de cerdo pelón mexicano, en respuesta al tipo de azúcar añadido al diluyente de congelación. No obstante, la glucosa y/o lactosa fueron los que proporcionaron las mejores características de motilidad en los espermatozoides post-descongelación; sin embargo, las variables observadas (Tabla 2) fueron de menor magnitud a las encontradas por otros autores tanto en cerdos de genotipo magro como graso ([De Mercado et al., 2010](#); [Malo et al., 2010](#)), pero similares a las observadas por [Sancho et al. \(2007\)](#) en cerdo ibérico y en cerdos Yorkshire por [Chanapiwat et al. \(2012\)](#), quienes recomiendan el uso de lactosa o fructosa en el diluyente de congelación. Por su



parte, [Gómez-Fernández et al. \(2012\)](#) sugieren el uso de disacáridos, dado que muestran mayor capacidad crioprotectora que los monosacáridos.

En todos los tratamientos evaluados, tanto la integridad del acrosoma como la viabilidad fue superior al 65 % (Tabla 3), los valores observados fueron superiores a los encontrados por diversos autores, tanto en cerdos de genotipo magro como graso ([Yang et al., 2016](#); [Chanapiwat et al., 2012](#); [De Mercado et al., 2010](#); [Malo et al., 2010](#); [Sancho et al., 2007](#)). Al respecto, [Buhr et al. \(2001\)](#) proponen crear un índice a partir de la información obtenida de los valores de motilidad y de la integridad de los acrosomas (MT % * AI %) de los espermatozoides, dicho índice podría aportar más información que los valores individuales. Al estimar dicho índice con base en los datos de [Malo et al. \(2010\)](#) se observa una relación directa entre el valor y la capacidad de penetración de los espermatozoides *in vitro*. En la Tabla 3, se presentan los datos respecto a dicho índice, en donde el mayor valor observado fue cuando se utilizó lactosa (T2) en el diluyente de congelación, contrario a lo observado por [Malo et al. \(2010\)](#), donde la glucosa mostró un índice similar.

El efecto de las temperaturas de congelación y descongelación sobre las membranas de las células espermáticas de los verracos y la amplia variación entre machos puede contribuir al poco éxito en la criopreservación del semen porcino ([Sancho et al., 2007](#); [Jovičić et al., 2020](#)). Por su parte, [Roca et al., \(2016\)](#) clasifican al semen porcino en base con la proporción de células vivas y muertas después de la descongelación, la cual a su vez está relacionada con la calidad del semen fresco atribuyéndolo al enriquecimiento de lípidos presentes en la membrana plasmática incluyendo triacilgliceroles y fosfolípidos por efecto de la yema de huevo durante la criopreservación.

CONCLUSIÓN

La adición de lactosa en el diluyente proporciona una mayor protección a las células espermáticas en la criopreservación del semen de cerdo pelón mexicano.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo se enmarca dentro del proyecto de Problemas Nacionales del CONACYT: “Conservación del cerdo pelón mexicano: Estrategias de producción sustentable para la zona maya de la Península de Yucatán”, clave 248961 y, forman parte de la tesis de maestría en ciencias del primer autor.

LITERATURA CITADA

ALKMIN DV, Perez-Patiño C, Barranco I, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J. 2014. Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. *Cryobiology*. 69(2): 203-210. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.004>



ATHURUPANA R, Takahashi D, Loki S, Funahashi H. 2015. Trehalose in glycerol-free freezing extender enhances post-thaw survival of boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*. 61(3):205-10. ISSN: 0916-8818 <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-152>

BAISHYA SK, Biswas RK, Kadirvel G, Deka BC, Kumar S, Sinha S, Dutta DJ, Saikia GK. 2014. Effect of conventional and controlled freezing method on the post-thaw characteristics of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 149 (3-4):231237. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.06.020>

BOES J; Boettcher P; Honkatukia M. 2023. Innovations in cryoconservation of animal genetic resources-Practical guide. In *FAO Animal Production and Health Guidelines, No. 33*; FAO: Rome, Italy, 3; Pp. 41-67. <https://doi.org/10.4060/cc3078en>

BLACKBURN D, Hiemstra J, Tixier-Boichard M. 2023. Innovations in cryoconservation of animal genetic resources: Practical guide. *FAO Animal Production and Health Guidelines, No. 33*. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc3078en>

BUHR MM, Fiser P, Bailey JL, Curtis EF. 2001. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *Journal of Andrology*. 22(6):961-969. ISSN: 1939-4640. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb03436.x>

CANTANHÊDE LF, Freitas EN, De Barros TB, Guimarães DB, Dias AV, Toniolli R. 2018. Use of alternative extender added of fructose aiming the cryopreservation of boar semen. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 55(1): 1-10. ISSN: 1678-4456. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.115739>

CONTRERAS J, Arias E, Fuentes F, Muñoz E, Bernecic N, Fair S, Felmer R. 2023. Cellular and molecular consequences of stallion sperm cryopreservation: Recent approaches to improve sperm survival. *Journal of Equine Veterinary Science*. 126: 104499. ISSN: 0737-0806. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104499>

CHANAPIWAT P, Kaeoket K, Tummaruk P. 2012. Cryopreservation of boar semen by egg yolk-based extenders containing lactose or fructose is better than sorbitol. *Journal of Veterinary Medical Science*. 74(3):351-354. ISSN: 0916-7250. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0273>



DE MERCADO E, Rodríguez A, Gómez E, Sanz E. 2010. Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa Comparison of different freezing extenders-based on post-thaw sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 118(1):54-61. ISSN: 0378-4320
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.006>

GOLSHAHI M, Aramli SM, Nazari MR, Habibi E. 2018. Disaccharide supplementation of extenders is an effective means of improving the cryopreservation of semen in sturgeon, *Aquaculture*. 486: 261-265. ISSN: 0044-8486.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.045>

GÓMEZ-FERNÁNDEZ J, Gómez-Izquierdo E, Tomás C, Mocé E, De Mercado E. 2012. Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 133(1-2):109-116. ISSN: 0378-4320.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.010>

HENSEL B, Pieper L, Jung M, Schulze M. 2023 Influence of age, breed, and season on the quality of boar semen stored at low-temperature. *Theriogenology*. 208: 102-108. ISSN: 1879-323.1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.06.010>

IZQUIERDO AC, Gutiérrez JP, Hernández WM, Mancera AV, Crispín RH. 2016. Obtención, evaluación y manipulación del semen de verraco en una unidad de producción mexicana. *Revista veterinaria*. 26(1): 69-74. ISSN: 1669-6840.
<http://www.scielo.org.ar/pdf/revet/v26n1/v26n1a13.pdf>

JOVIČIĆ M, Chmelíková E, Sedmíková M. 2020. Cryopreservation of boar semen. *Czech Journal of Animal Science*. 65(4):115-123. ISSN: 1805-9309.
<https://doi.org/10.17221/47/2020-CJAS>

JIN H, Choi W, Matsumura K, Hyon SH, Gen Y, Hayashi M, Miyoshi K. 2022. Cryopreservation of pig spermatozoa using carboxylated poly-L-lysine as cryoprotectant. *Journal of Reproduction and Development*. 68 (5): 312-317. ISSN: 1348-4400.
<https://doi.org/10.1262/jrd.2022-058>

KUCHA C, Liu L, Ngadi M, Gariépy C. 2023. Hyperspectral imaging and chemometrics assessment of intramuscular fat in pork Longissimus thoracic et lumborum primal cut. *Food Control*. 145: 109379. ISSN 0956-7135.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109379>



KAMAL M, Alam E, Das K, Yeasmin S, Ahmed S, Rahman A, Masum 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. ISSN: 2311-7710. <http://dx.doi.org/10.5455/javar.2023.j666>

MALO C, Gil L, Gonzalez N, Cano R, De Blas I, Espinosa E. 2010. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk-based extender. *Cryobiology*. 61(1):17–21. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.03.008>

National Research Council. 2012. Nutrient requirements of swine. Eleventh Revised Edition. Washington, DC: *The National Academies Press*. <https://doi.org/10.17226/13298>.

OZIMIC S, Ban-Frangez H, Stimpfel M. 2023. Sperm cryopreservation today: approaches, efficiency, and pitfalls. *Molecular Biology*. 45: 4716-4734. ISSN: 1467-3045. <https://doi.org/10.3390/cimb45060300>

PEDROSA CA, Torres AM, Alkmin VD, Pinzon EPJ, Martins KMMS, da Silveira CJ, de Andrade CFA. 2021. Spermatozoa and seminal plasma small extracellular vesicles miRNAs as biomarkers of boar semen cryotolerance. *Theriogenology*. 174: 60-72. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.07.022>.

PEZO F, Zambrano F, Uribe P, Risopatrón J, Moya C, De andrade AFC, Sánchez R. 2020. Oxidative and nitrosative stress in frozen-thawed pig spermatozoa. II: Effect of the addition of saccharides to freezing medium on sperm function. *Criobiology*. 97: 5-11. ISSN:1090-2392. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.015>

PURSEL VG, Johnson LA. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*. 40(1):99-02. ISSN: 0021-8812. <https://doi.org/10.2527/jas1975.40199x>

ROCA J, Parrilla I, Gil AM, Cuello C, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H. 2016. Non-viable sperm in the ejaculate: Lethal escorts for Contemporary viable sperm. *Animal Reproduction Science*. ISSN: 1873-2232. 169:24-31. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.028>



SANCHO S, Casas I, Ekwall H, Saravia F, Rodriguez-Martinez H, Rodriguez-Gil JE, Flores E, Pinart E, Briz M, García-Gil N, Bassols J, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. 2007. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Reproduction*. 134(1):111-121. ISSN: 1470-1626. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0118>

RATCHAMAK R, Vongpralub T, Boonkum W, Chankitisakul V. 2019: Cryopreservation and quality assessment of boar semen collected from bulk samples. *Veterinarni Medicina*, 64: 209-216. ISSN: 1805-9392. <https://doi.org/10.17221/125/2018-VETMED>

SIEME H, Oldenhof H, Wolkers WF. 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*. 169: 2-5. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004>

SILVA CG, Cunha E R, Blume GR., Malaquias JV, Bão SN, Martins CF. 2015. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology*. 70(2):90-94. ISSN: 1090-2392. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.01.001>

SOCOL CT, Rusu AV, Criste FL, Mihalca I. 2015. Current aspects of boar semen cryopreservation. *Porcine Research*. 5(2): 44-50. ISSN: 2248-311X. <http://www.porc.bioflux.com.ro/>

VÁZQUEZ JM, Martínez EA, Martínez P, García AC, Roca J. 1997. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriogenology*. 47(4): 913-922. ISSN: 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00046-0)

YANG CH, Wu TW, Cheng FP, Wang JH, Wu JT. 2016. Effects of different cryoprotectants and freezing methods on post-thaw boar semen quality. *Reproduction Biology*. 16(1):41-46. ISSN: 1642-431X. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2015.12.008>

ZENG WX, ShimadaM, Isobe N, Terada T. 2001. Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality. *Theriogenology*. 56(3):447-458. ISSN: 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00576-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00576-3)

Errata Erratum

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>