

MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD DE SEMEN DE VERRACO POST-DESCONGELAMIENTO POR EFECTO DE LA L-GLUTAMINA (I-Gln) Y *Orvus Es Paste* (OEP)

L. Meyer Flores¹; C. G. Germán Alarcón²

¹Departamento de zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera Federal México-Texcoco C.P. 56230. Texcoco, Estado de México. México. Correo-e: meylauris@hotmail.com

²Director de tesis. Departamento de zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera Federal México-Texcoco C.P. 56230. Texcoco, Estado de México. México. Correo-e: gcarlosg@terra.com.mx (Autor responsable)

RESUMEN

Con objeto de evaluar el efecto del *Orvus Es Paste* (OEP) y I-Glutamina (I-Gln) en el mejoramiento de la calidad del semen de verraco post-descongelamiento, se colectó semen de dos verracos de la raza Pietrain de dos años con buena condición corporal y fertilidad probada. Las muestras de semen se juntaron para hacer una mezcla hetero-espermática, la cual se diluyó (37 °C) en una solución BTS. Para la etapa de enfriamiento (21 °C) se usó un diluyente lactosa-yema (80 mL de agua destilada, 20 mL de yema de huevo y 8.8 g de Lactosa). En la etapa de congelamiento los tratamientos experimentales fueron: **T1**: Testigo 0% OEP + 0.0 mM I-Gln, **T2**: 1.5% OEP + 80 mM I-Gln, **T3**: 1.5% OEP + 160 mM I-Gln, **T4**: 3% OEP + 80 mM I-Gln, **T5**: 3% OEP + 160 mM I-Gln. En proceso de congelamiento se usó una máquina enfriadora-congeladora pre-programada Freeze Control[®]. Las variables evaluadas post-descongelamiento fueron: Motilidad individual progresiva (MIP), Viabilidad espermática e Integridad acrosomal. Se encontraron diferencias ($p < 0.05$) en viabilidad espermática, el T5 presentó mayor porcentaje de células vivas. Respecto a la MIP e Integridad acrosomal no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) entre tratamientos. Se concluye que el *Orvus Es Paste* y la I-Glutamina favorecen la calidad espermática del semen de verraco post-descongelamiento.

Palabras clave: Semen, verraco, congelamiento, criopreservación, *Orvus Es Paste*, I-Glutamina

IMPROVING THE QUALITY OF POST-THAWING OF BOAR SEMEN BY L-GLUTAMINE AND *Orvus Es Paste* (OEP) EFFECT.

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of *Orvus Es Paste* (EPO) and L-Glutamine (L-Gln) in improving the quality of boar semen post-thaw was collected semen from two boars Pietrain breed 2 years with good body condition those who had been previously evaluated quality of semen. Semen samples were mixed together to make a pull, then the mixture was diluted (37 °C) in a BTS solution (0.027 M glucose, EDTA 0.004 M, 0.023 M sodium citrate, 0.014 M sodium bicarbonate and 0.010 M potassium chloride in 1 liter of distilled water). For the cooling stage (21 °C) used a lactose-yolk diluent (80 mL of distilled water, 20 mL egg yolk and 8.8 g of lactose). In the freezing stage of the experimental treatments were: T1: OEP 0% + 0.0 mM L-Gln, T2: 1.5% OEP + 80 mM L-Gln, T3: 1.5% OEP + 160 mM L-Gln, T4: 3% OEP + 80 mM L-Gln, T5: 3% OEP + 160 mM L-Gln. In the process of freezing a cooling machine was used pre-programmed freezer (Freeze Control®). The post-thaw variables were evaluated: individual progressive motility (IPM), sperm viability and acrosomal integrity. Significant difference ($p < 0.05$) sperm viability in the variable in which the T5 presented higher percentage of living cells. There was no significant difference ($p > 0.05$) between treatments for the IMP variables, acrosomal integrity. It is concluded that the *Orvus Es Paste* and L-Glutamine favor sperm quality of boar semen after freezing.

Keywords: Semen, boar, freezing, crypreservation, *Orvus Es Paste*, L-Glutamine.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, y considerando el gran potencial de las técnicas de reproducción asistida en los cerdos, se han realizado múltiples investigaciones y el uso de la inseminación artificial (IA) en la industria está creciendo rápidamente (Weitze, 2000). La inseminación artificial con semen fresco o almacenado es actualmente la tecnología que se utiliza a escala comercial en el sector porcino (Parrila *et al.*, 2009). Sin embargo, el uso de semen congelado no ha llegado a los niveles de otras especies como la bovina (Echegaray, 2001), ya que sólo representa el 0.2% del total de las inseminaciones realizadas en el mundo (Domínguez *et al.*, 2010).

El empleo de semen congelado-descongelado para la IA podría jugar un papel clave en la mejora genética y control del riesgo por enfermedades, ya que al tener una vida útil ilimitada, permitiría que la comercialización del semen de un reproductor sólo se haga hasta que éste sea declarado libre de enfermedades (Bailey *et al.*, 2008). Los estudios actuales con semen congelado tienen como objetivo perfeccionar los procesos de congelación de los espermatozoides y garantizar el número suficiente de éstos con capacidad fecundante al momento de la ovulación (Marinescu *et al.*, 2000). La baja fertilidad obtenida inseminando con semen congelado se debe posiblemente a una combinación de efectos perjudiciales sobre la fisiología y morfología de los espermatozoides durante el proceso de congelado-descongelado (Medrano y Holt, 1998).

Los métodos estándar de congelación-descongelación empleados en otras especies no producen resultados equivalentes en el semen porcino, debido a las diferencias en la susceptibilidad del semen de los individuos a la crioconservación, ya que el semen de algunos cerdos sobrevive a la congelación con menor daño que el de otros, independientemente de su calidad inicial. A los primeros se les ha llamado “goodfreezers” y “badfreezers” a los segundos (Medrano y Holt, 1998).

Se han usado una gran variedad de extensores o medios en la congelación de espermatozoides de mamíferos. No obstante que la mayoría de los medios de las

diferentes especies incorporan diferentes componentes, normalmente incluyen una fuente energética y un crioprotector (Steinbach y Foote, 1964; Salamon y Visser, 1972; Samper y Morris, 1998). El glicerol actualmente es el crioprotector más común que permea al interior los espermatozoides antes del congelamiento de semen del ganado bovino (Holt, 2000b). Desafortunadamente, la exposición de las células al glicerol, ya sea en concentraciones altas o durante periodos prolongados provoca la muerte celular. Por lo cual, es importante determinar su concentración óptima para obtener un efecto crioprotector y reducir al mínimo el daño a la célula (Woods *et al.*, 2004).

La yema de huevo es un crioprotector natural que protege al espermatozoide del shock por frío durante la congelación y descongelación (Salamon y Maxwell, 2000). El mecanismo no está totalmente esclarecido, sin embargo, la mayoría de los investigadores coinciden en que dicho agente interactúa con la membrana plasmática, estabilizándola (Watson, 1975).

El *Orvus Es Paste* (OEP) otro crioprotector usado ampliamente en el congelamiento de semen de diversas especies, ayuda a proteger las células en el proceso del congelamiento-descongelamiento, aunque no está completamente claro su mecanismo de acción. El OEP al parecer aumenta el efecto protector de la yema de huevo, rompiendo los lípidos de la yema del huevo y los hace más disponibles a la membrana del espermatozoide (Pontbriand *et al.*, 1989).

Algunos aminoácidos como la L-Glutamina (L-Gln) se ha usado recientemente en la criopreservación exitosa de semen de diferentes especies de mamíferos como el de macho cabrío (Kundu *et al.*, 2001; Alí Al Ahmad, 2008), equino (Trimeche *et al.*, 1999), carnero (Sánchez-Partida *et al.*, 1998), mono (Li *et al.*, 2003) y humano (Renard *et al.*, 1996).

Sorprendentemente la I-GIn no había sido usada en el congelamiento de semen de cerdo a pesar de contribuir en el mejoramiento de la calidad del semen congelado en otras especies (Roca *et al.*, 2006).

Por lo antes expuesto resulta necesario hacer investigaciones que nos permitan dilucidar si algunos aditivos como el OEP y la I-GIn podrán tener efectos benéficos en la calidad del semen de cerdo post-descongelamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó durante los meses de mayo, junio y julio de 2011 en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Granja Experimental del Departamento de Zootecnia de La Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en el Estado de México a 19° 29' latitud Norte y 98° 54' longitud Oeste y a una altitud de 2250 msnm. La clasificación del clima de acuerdo a García (1981) es C (wO) (w) b (i) q, templado sub-húmedo, con lluvias en verano.

Colección, enfriamiento y congelamiento de semen

Se utilizaron dos verracos de dos años de edad de la raza Pietrain de fertilidad probada, mantenidos bajo las mismas condiciones de manejo y alimentación. De cada verraco se realizaron ocho colecciones con intervalos de cinco días, por el método de la mano enguantada. En cada colección se realizó una mezcla heteroespermática e inmediatamente se procedió a diluir (2:1) con solución BTS (glucosa 0.027 M, EDTA 0.004 M, citrato de sodio 0.023 M, bicarbonato de sodio 0.014 M y cloruro de potasio 0.010 M en 1 litro de agua destilada) precalentada a 37 °C (Pursel y Johnson, 1975), se colocó a baño maría donde permaneció durante dos horas hasta alcanzar la temperatura ambiente (21 °C). Posteriormente se separó en tubos graduados hasta 35 mL y fueron centrifugados a 800 g durante 10 minutos. Luego de lo cual se retiró el sobrenadante y se procedió a la dilución con lactosa-yema (80 mL de agua destilada, 20 mL de yema de huevo y 8.8 g de Lactosa) hasta 3.5 mL (Galo y Uclés, 2003), solubilizando cuidadosamente.

Inmediatamente después se procedió a diluir (1:1) con los tratamientos siguientes hasta alcanzar 5 mL. **T1** o testigo: 95.0 mL de lactosa-yema, 200 µg de acetato

de tocoferol, 5 mL de glicerol, 0% de OEP y 0.0 mM de I-Gln, **T2**: 93.5 ml de lactosa-yema, 200 µg de acetato de tocoferol, 5 mL de glicerol 3% OEP + 160 mM de I-Gln, **T3**: 93.5 mL de lactosa-yema, 200 µg de acetato de tocoferol, 5 mL de glicerol 3% OEP + 320 mM I-Gln, **T4**: 92.0 mL de lactosa-yema, 200 µg de acetato de tocoferol, 5 mL de glicerol 6% OEP + 160 mM I-Gln, **T5**: 92.0 mL de lactosa-yema, 200 µg de acetato de tocoferol, 5 mL de glicerol 6% OEP + 320 mM I-Gln. Con las diluciones las concentraciones de los componentes quedaron al 50% de lo descrito anteriormente.

Para el envasado del semen se utilizaron pajillas de 0.5 mL (IMV, Francia). El llenado se hizo manualmente y posteriormente se sellaron con alcohol polivinílico. El proceso de congelamiento se llevó a cabo de acuerdo a una curva de congelamiento para semen de cerdo, previamente diseñada para el enfriador-congelador automático Freeze Control[®] hasta alcanzar temperaturas inferiores a -35 °C, se trasladaron a una cámara con nitrógeno líquido para su acomodo en gobelets y posteriormente a las canastillas de un termo con nitrógeno líquido.

Descongelamiento y evaluación de semen

El procedimiento consistió en transferir las pajillas a un termo descongelador con agua a 37 °C durante 45 segundos. Cada pajilla se dividió para su posterior evaluación.

La evaluación de la motilidad individual progresiva (MIP) se llevó a cabo en un microscopio con platina térmica a 37 °C, se colocó un portaobjetos en la platina donde se depositó una gota de semen descongelado. La evaluación de la MIP se determinó mediante observación visual en microscopio de luz a 10X (Trujillo *et al.*, 2002), por una persona con experiencia en evaluación de semen. Cada muestra se observó por lo menos en ocho campos predeterminados (secuencias).

La evaluación de la viabilidad espermática se realizó por medio de la tinción eosina-nigrosina, para lo que se colocó una gota de semen descongelado en un portaobjetos tibio (37 °C) y se agregó una gota de colorante, se mezclaron rápidamente y fueron fijados con calor, posteriormente se observaron en un microscopio compuesto 40X. Los espermatozoides transparentes indican que la

célula estaba viva al momento de la tinción, mientras que los coloreados o rosados indican que la célula estaba muerta (Holý, 1987). Se contabilizaron 100 espermatozoides por muestra.

La integridad del acrosoma se evaluó mediante microscopía de contraste de fases, para lo cual las muestras primeramente se incluyeron en una solución de glutaraldehído al 2% (solución acuosa al 70%; Sigma chem. Co., St. Louis, Mo) (Pursell y Johnson, 1974) para posteriormente hacer una frotis el cual se fijó con calor y se observó a 100X. La valoración se efectuó clasificando el acrosoma en tres grupos diferentes: normal (sin daño), dañado y desprendido (Watson y Martín, 1972). Se evaluaron 100 espermatozoides por muestra.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANAVA) y una prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1998) para comparar los valores medios de los tratamientos, cuando el valor F sea significativo ($p < 0.05$), mediante el paquete estadístico SAS (2000). El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo de parcelas divididas, donde la parcela grande fue el tratamiento y la parcela chica el número de colección.

RESULTADOS

El Cuadro 1 muestra los porcentajes de motilidad individual progresiva, viabilidad espermática e integridad acrosomal obtenidos en semen post-descongelamiento. No se encontraron diferencias entre tratamientos para la variable MIP ($p > 0.05$); aún así, el tratamiento 5 que contenía 160 mM de l-Gln y 3 % de OEP, presentó mayor MIP (29.28%) en comparación con el tratamiento 1 (Testigo), que presentó el valor más bajo (24.59%). En la variable viabilidad espermática únicamente se encontraron diferencias en los tratamientos 4 y 5 con respecto al testigo ($P < 0.05$), el tratamiento 5 (160 mM de l-Gln y 3% de OEP), presentó mayor porcentaje de viabilidad (73.88%), mientras que en el testigo el porcentaje de espermatozoides vivos presentó 64.13%. En el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) entre tratamientos,

pero el tratamiento 3 que contenía 160 mM de l-Gln y 1.5% de OEP, obtuvo el mayor porcentaje (64.84%). Los espermatozoides con acrosoma dañado no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$); pero el mayor daño se encontró en el tratamiento 5 (34.38%) mientras que el menor daño se tuvo en el tratamiento 3 (30.41%). En cuanto al porcentaje de espermatozoides con acrosoma desprendido, tampoco hubo diferencias ($p>0.05$), el mayor valor se presentó en el tratamiento 4 (80 mM de l-Gln y 3% de OEP) (5.66%) y el menor valor lo tuvo el tratamiento 5.

Cuadro 1. Calidad espermática de semen de verraco post-descongelamiento por tratamiento (Media \pm E.E.).

Variables espermáticas	T1 (0 mM l-Gln + 0 mL OEP)	T2 (80 mM l-Gln + 1.5 mL OEP)	T3 (160 mM l-Gln + 1.5 mL OEP)	T4 (80 mM l-Gln + 3 mL OEP)	T5 (160 mM l-Gln + 3 mL OEP)
Motilidad progresiva (%)	24.59 \pm 3.32 A	25.53 \pm 2.73 A	27.81 \pm 2.94 A	27.78 \pm 2.62 A	29.28 \pm 3.16 A
Espermatozoides vivos (%)	64.13 \pm 1.48 B	68.69 \pm 1.90 AB	70.97 \pm 1.33 AB	72.63 \pm 1.20 A	73.88 \pm 1.12 A
Espermatozoides muertos (%)	35.88 \pm 1.48 A	31.34 \pm 1.90 AB	29.03 \pm 1.33 AB	27.38 \pm 1.20 B	26.13 \pm 1.12 B
Acrosoma intacto (%)	62.19 \pm 1.40 A	64.25 \pm 1.59 A	64.84 \pm 1.33 A	63.09 \pm 1.36 A	61.44 \pm 1.25 A
Acrosoma dañado (%)	32.19 \pm 1.38 A	31.16 \pm 1.36 A	30.41 \pm 1.17 A	31.25 \pm 1.41 A	34.38 \pm 1.33 A
Acrosoma desprendido (%)	5.63 \pm 0.68 A	4.59 \pm 0.60 A	4.78 \pm 0.77 A	5.66 \pm 0.77 A	4.50 \pm 0.63 A

*Medias con la misma letra mayúscula por hilera no son diferentes ($P>0.05$).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Pursel *et al.* (1978) reportaron que la adición de 0.5 – 1.5% de OEP era la concentración óptima para mantener y mejorar la motilidad espermática y la integridad acrosomal del semen congelado-descongelado de cerdo. De Mercado *et al.* (2010) indican que cuando se excede este límite puede presentarse un efecto negativo atribuido al OEP sobre todo por un mayor tiempo de exposición antes del congelamiento ya que esta sustancia al ser un detergente tiene acción espermicida (Helenius y Simons, 1975; Pursel *et al.*, 1978).

En el presente estudio, aún cuando no se observaron diferencias ($p>0.05$) en motilidad individual progresiva (MIP) se observó una tendencia que a mayor concentración de OEP la MIP se incrementaba, lo cual coincide con lo reportado por De Mercado *et al.* (2010), quienes en un estudio similar al presente con 1.5%

de OEP obtuvieron mayor porcentaje de motilidad individual progresiva así como mayor actividad mitocondrial ($p < 0.001$) cuando incorporaron el OEP poco antes del congelamiento, no así cuando la adición del OEP se hacía desde el momento en que se iniciaba el descenso de temperatura de 37 °C a 5 °C. Por lo tanto es posible que el semen de verraco pudiera tolerar inclusive un mayor porcentaje de esta sustancia sin detrimento de las características seminales siempre y cuando la exposición se haga por un periodo de tiempo muy breve antes del congelamiento (De Mercado *et al.*, 2010), dichos resultados soportan los obtenidos en el presente estudio, ya que la adición de OEP se hizo momentos antes del congelamiento aún cuando su concentración fue el doble (3%).

El OEP únicamente mejora la función espermática en presencia de la yema de huevo (Hofmo y Almlid, 1991), presumiblemente porque dispersa mejor los conglomerados de lípidos de la yema formados después de la dilución del semen (Strzezek *et al.*, 1984) y no a través de un efecto directo en la membrana (Pursel *et al.*, 1978; Pontbriand *et al.*, 1989).

Anchordoguy *et al.* (1988) informaron que en diversos organismos los aminoácidos como la glicina y alanina se acumulan en respuesta a la exposición al frío. Estos aminoácidos se cree desempeñan un papel importante en la prevención de daños en la estructura de la célula durante el congelamiento; su habilidad para mejorar la sobrevivencia de los espermatozoides ha sido relacionada con sus propiedades metabólicas, crioprotectoras, oxidativas o reguladoras de la presión osmótica (Martins-Bessa *et al.*, 2007). Las propiedades crioprotectoras de la l-Gln en las células de mamíferos fueron por primera vez reportadas hace 20 años por (Kruuv *et al.*, 1988) y posteriormente confirmadas con espermatozoides (Kruuv y Glofcheski, 1992; Renard *et al.*, 1995).

Diversos autores (Kundu *et al.*, 2001; Khlifauoui *et al.*, 2005) mencionan que las propiedades crioprotectoras de la l-Gln en espermatozoides de mamífero pueden variar de acuerdo a la concentración usada, debido a una mayor sensibilidad de los espermatozoides a la l-Gln.

En este sentido concentraciones superiores a 100 mM pueden ser ineficaces o inclusive tóxicas (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008). En el presente estudio se ensayaron dos niveles de I-Glutamina (I-Gln) (80 y 160 mM), habiéndose encontrado mayor cantidad de células vivas con 160 mM ($p < 0.05$), lo cual coincide con lo reportado por Trimeche *et al.* (1999) quienes en un estudio donde probaron 80, 160 y 240 mM de I-Gln tuvieron mejores resultados (69.1% y 70.1%) cuando adicionaban 80 y 160 mM de esta sustancia, no así con 240 mM (66.7%). Sin embargo, otros investigadores no han encontrado efecto benéfico con la adición de I-Gln (Neira *et al.*, 2007; Phetudomsinsuk *et al.*, 2009).

Kruuv y Glodchesky (1992) y Khlifouy *et al.* (2005) sugieren que la I-Gln pudiera sustituir parcialmente al glicerol. Otra posibilidad es que la I-Gln pudiera jugar un papel directo en la acción crioprotectiva en la membrana de los espermatozoides, principalmente como estabilizador (Anchordoguy *et al.*, 1988; Kundu *et al.*, 2001). Nuestros resultados podrían estar de acuerdo con esta posibilidad, debido a que el porcentaje de espermatozoides fue mayor con las muestras congeladas en presencia de I-Gln.

CONCLUSIONES

La adición de *Orvus Es Paste* y I-Glutamina al semen de cerdo incrementó la viabilidad espermática post-descongelamiento en los tratamientos T4 y T5 respecto al testigo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Investigación y Posgrado por el apoyo brindado en el proyecto 10020522.

Al Laboratorio de Reproducción de ovinos y caprinos La Roca del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Por su valiosa contribución con materiales y equipo.

LITERATURA CITADA

- ALI AL AHMAD, M.; CHATAGNON, G.; AMIRAT- BRIAND, L.; MOUSSA, M.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. AND FIENI, F. 2008. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 429-436.
- ANCHORDOGUY, T.; CARPENER, J.F.; LOOMIS, S.H. AND GROWE, J.H.; 1988. Mechanisms of interactions of amino acids with phospholipid bilayers during freezing. *Biochim. Biophys. Acta* 946: 299-306.
- BAILEY, J. L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BREQUE, C.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W. AND GALANTINO-HOMER, H. L. 2008. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 70: 1251-1259.
- 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: 54-61.
- DOMÍNGUEZ, J.C.; CISALE, H.; KIRWOOD, R.; BREININGER, E.; GONZÁLEZ, R.; TEJERINA, F.; ALEGRE, B.; ALEGRE, E.; PELÁEZ, J.; GARCÍA, J.C.; BERNAL, S.; CÁRDENAS, S.; CÓRDOVA, C.A.; ABAD, F.; MANJARIN, R. Y MARTÍN, D. 2010. La criopreservación de semen porcino. *Albeitar* 119: 14-15.
- ECHEGARAY, A. 2003. ¿Para cuándo el semen de porcino congelado?. *Venezuela Porcina*. Año 17. Nº 48: 3-5.
- GARCÍA, M.E. 1981. Modificación al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 3ª.Ed. Instituto de Geografía, UNAM, México, D.F. 246 p.
- HELENIUS, A. AND SIMONS, K. 1975. Solubilisation of membrane by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 415: 29-34.
- HOFMO, P.O., ALMLID, T. 1991. Recent developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. In: Johnson, L.A., Rath, D. _Eds., *Boar Semen Preservation II*. Paul Parey, Berlin, pp. 111–122.

- HOLY, L. 1987. Biología de la Reproducción Bovina. Introducción al proceso del examen de fertilidad de la hembra y el macho. 2 Edición. La Habana. Editorial Científico-Técnica. 344 p.
- HOLT, W. V. 2000b. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53: 47-58.
- KHLIFAOU, M.; BATTUT, I.; BRUYAS, J.F.; CHATAGNON, G.; TRIMECHE, A. AND TAINTURIER, D. 2005. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology* 63: 138-149.
- KRUUV, J. AND GLOFCHESKI, D.J., 1992. Protective effects of amino acids against freeze-thaw damage in mammalian cells. *Cryobiology* 29: 291-295.
- KRUUV, J.; GLOFCHESKI, D.J.; LEPOCK, J.R. 1988. Protective effect of L-glutamine against freeze-thaw damage in mammalian cells. *Cryobiology* 25: 121-130.
- KUNDU, C.N.; DAS, K.; MAJUMDER, G.C. 2001. Effect of amino acids on goat cauda epididimal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology* 42: 21-27.
- LI, Y.; SI, W.; ZHANG, X.; DINNYES, A.; JI, W.; 2003. Effect of amino acids on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. *Am. J. Primatol.* 59: 159-165.
- MARINESCU, A.G; FEREDAN, T; ARISANU, I. 2000. Investigations of boar semen preservation by freezing. *Rev Roum Biol Anim. Tome 45. Nº 2:16.*
- MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. 2007. Incorporation of taurine and hypoaurine did not improve the efficiency of the Uppsala equine extender for dog semen freezing. *Theriogenology* 68: 1088-1096.
- MEDRANO, A. Y HOLT W. 1998. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado – descongelado. *Arch. Zootec.* 47: 319–327.
- NEIRA, J.A.; RAMÍREZ, G.F.; LEÓN, G.S.A.; MORENO, G.D.A. 2007. Efecto de la asociación L-Glutamina-etilenglicol en la criopreservación de semen equino. *Revista de Medicina Veterinaria* 14: 93-105.

- PARRILLA, I.; VÁZQUEZ, J.M.; CABALLERO, I.; GIL, M.A.; HERNÁNDEZ, M.; ROCA, J.; LUCAS, X. AND MARTÍNEZ, E.A. 2009. Optimal characteristics of spermatozoa for semen technologies in pigs. Soc Reprod. Fertil. Suppl. 66: 37-50.
- PHETUDOMSINSUK, K.; SIRINARUMITR, K.; CHOOTHEA, A.; SUTHANMAPINUNT, P.; KORNKAEWRAT, K.; LAIKUL, A; AMORNSAK, S. AND PINYOPUMMIN, A. 2009. Freezability of thai native crossbrid horse semen in different extenders. Thai. J. Vet. Med. 39: 105-114.
- PONTBRIAND, D.; HOWARD, J.G.; SCHIEWE, M.C.; STUART, L.D. AND WILDT, D.E. 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa Cryobiology 26: 341-354.
- PURSEL, V. G., AND JOHNSON, L. A. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. J. Anim. Sci. 40: 99-102.
- PURSEL, V. G.; SCHULMAN, L. L. AND JOHNSON, L. A. 1978. Effect of Orvus ES paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. J. Anim. Sci. 47: 198-202.
- PURSEL, V.; JOHNSON, L. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation Theriogenology 1: 63-68.
- RENARD, P.; GRIZARD, G.; GRIVEAU, J.F.; SION, B.; BOUCHER, D.; LE LANNOU, D. 1996. Improvement of motility and fertilization potential of post-thaw human sperm using glutamine. Cryobiology 33: 311-319.
- ROCA, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; VÁZQUEZ, J.M.; BOLARIN, A.; HERNÁNDEZ, M.; SARAVIA, F.; WALLGEN, M.; MARTÍNEZ, E.A. 2006. Strategies to improve the fertility of boar spermatozoa in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. J. Androl. 26: 15-24.
- SALAMON, S. AND MAXWELL, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science 62: 77-111.

- SALAMON, S. AND VISSER, D. 1972. Effect of composition of Tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Australian Journal of Biological Science* 25: 605-618.
- SAMPER, J.C. AND MORRIS, C.A. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey *Theriogenology* 49: 895-903.
- SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHEL, B.P. AND MAXWELL, W.M., 1998. Effect of compatible solutes and diluents composition on the post-thaw motility of ram sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 10: 347-357.
- SAS, 2000. JMP. *Statistic Visual. Versión 8.1.* Institute Inc. Campus Drive. Cary. NC 27517.
- STEEL, R.G. Y J.H. TORRIE. 1998. *Bioestadística: Principios y Procedimientos.* 2da. Ed. (1ª en español). McGraw Hill. México. 71-74 p.
- STEINBACH, J. AND FOOTE, R.H. 1964. Effect of catalase and anaerobic conditions upon the post thawing survival of bovine spermatozoa semen. *Journal of Dairy Science* 47: 812-815.
- STRZEZEK, J.; LAPKIEWICZ, S. AND LECEWICZ, M. 1984. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. *Animal Science Papers and Reports* 17: 181-188.
- TRIMECHE, A.; YVON, J.M.; VIDAMENT, M.; PALMER, E. AND MAGISTRINI, M., 1999. Effects of glutamine, proline, histidine and betamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 45: 1015-1027.
- TRUJILLO, O. M. E; MARTÍNEZ, G. R. G AND HERRADORA, L. M. A. 2002. *La Piara Reproductora.* Editorial Mundi-prensa. México, D.F. 165-185 pp.
- WATSON P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871-891.
- WATSON, P.F. AND MARTIN, I.C. 1972. Comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 28: 99-101.

WEITZE, K.F. 2000. 'Update on the worldwide application of swine A.I.' In Boar semen preservation IV (Eds, Johnson, L.A. and Guthrie, H.D.) Allen Press Inc, Lawrence, KS, pp. 141-145.

WOODS, E.J.; BENSON, J.D.; AGCA, Y. AND CRITSER, J.K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology 48: 146-156.