

## CAMBIOS DE LA MOTILIDAD EN LA PRUEBA DE TERMORESISTENCIA EMPLEANDO DIFERENTES DILUYENTES PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN PORCINO

J.A. Benítez,<sup>1</sup> R. Navarrete<sup>1</sup>, C. Lemus<sup>1</sup>, Madelyn Rueda<sup>2</sup>, Teresa Arias<sup>2</sup>, María Guadalupe Orozco<sup>1</sup> y J.A. Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la Cultura "Amado Nervo", Tepic, CP 63190. Nayarit, México  
email: joalbm\_22@yahoo.com.mx , drclemus@yahoo.com.mx

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Porcinas. Apartado Postal No. 1, Punta Brava. La Habana, Cuba  
email: mrueda@iip.co.cu

### RESUMEN

*Se usó una clasificación simple para examinar cambios de la motilidad de espermatozoides durante la prueba de termoresistencia en un total de 10 eyaculados de un semental Pietrain x Yorkshire de dos años de edad. Para la congelación del semen se formaron cuatro tratamientos con diferentes diluyentes: Westendorf modificado, Thilmant, trehalosa con glicerol y trehalosa sin glicerol. Se evaluaron los cambios de la motilidad espermática en la prueba de termoresistencia en el semen descongelado después de 15 días de conservación. Las pajillas fueron descongeladas a una temperatura de 56°C durante un tiempo de 12 segundos y después las mediciones se efectuaron cada 15 min durante dos horas a 37°C. Se analizaron 10 pajillas por eyaculado en cada tratamiento.*

*Los valores medios globales de motilidad obtenidos en el semen fresco y descongelado fueron de 87.50 y 26.35%, en ese orden ( $P < 0.01$ ). No se encontró efecto significativo ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos para la motilidad espermática en los distintos tiempos de la prueba de termoresistencia, manifestándose valores similares entre tratamientos excepto con el diluyente de trehalosa sin glicerol, que determinó resultados significativamente ( $P < 0.01$ ) inferiores a los de los otros tres.*

*Ya que los mejores resultados de motilidad en la prueba de termoresistencia de los espermatozoides congelados/descongelados fueron conseguidos con los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y trehalosa con glicerol como diluyentes, se recomienda su uso en pruebas de conservación de semen porcino.*

**Palabras claves:** semen porcino, motilidad, termoresistencia, diluyentes

**Título corto:** Evaluación de motilidad en semen porcino crioconservado

## CHANGES OF MOTILITY IN THE THERMORESISTANCE TEST BY USING DIFFERENT EXTENDERS FOR PIG SEMEN CRYOPRESERVATION

### SUMMARY

*A one-way analysis of variance was employed to examine spermatozoa motility during the thermoresistance test after cryopreservation of 10 ejaculates from a Pietrain x Yorkshire boar of two years old. There were four extenders: Westendorf modified, Thilmant, trehalose plus glycerol and trehalose without glycerol. Changes in spermatozoa motility were evaluated during the thermoresistance test in thawed semen after 15 days of conservation. The straws were thawed at 56°C during 12 seconds and thereafter measurements were conducted every 15 min during two hours at 37°C. Ten straws per ejaculate were analyzed in every treatment.*

*Mean values for motility found in fresh and thawed pig semen were 87.5 and 26.35% in this order ( $P < 0.01$ ). There were not significant ( $P > 0.05$ ) effect among treatments for spermatozoa motility at the different times of the thermoresistance test, with similar values in all treatment except for the extender of glycerol without trehalose, which determined values significantly ( $P < 0.01$ ) lower as compared to the other three extenders.*

*Since best results of motility during the evaluation of thermoresistance in frozen/thawed spermatozoa were obtained with Westendorf modified, Thilmant and trehalose plus glycerol as extenders, its use for conservation of pig semen is recommended.*

**Key words:** boar semen, motility, thermoresistance, extenders

**Short title:** Evaluation of thermoresistance in cryopreserved boar semen

## INTRODUCCIÓN

El uso de semen congelado puede hoy en día aportar ciertas ventajas sobre el semen refrigerado, como son el transporte a largas distancias o la conservación durante un tiempo prolongado (Reed 1985), con resultados productivos que progresivamente mejoran y se acercan a los obtenidos con semen fresco o refrigerado (Gadea 2004; Roa et al 2005).

Las investigaciones actuales para mejorar los resultados con semen congelado tienen como objetivo optimizar los procesos de congelación de los espermatozoides y garantizar el número suficiente de estos con capacidad fecundante al momento de la ovulación (Pallas y De Alba 2003). Aunque los estudios y modificaciones más recientes en la técnica y aplicación de semen congelado han mejorado significativamente los resultados de fertilidad y prolificidad (Thilmant 1998; Eriksson et al 2002; Sellés et al 2003), las investigaciones deben continuar con el fin de minimizar los daños de la congelación sobre la célula espermática, así como encontrar nuevos métodos para valorar la viabilidad y capacidad fecundante del semen descongelado (Pallas y De Alba 2002).

En la actualidad, no existe una técnica estandarizada o un protocolo específico para congelar semen porcino, y respecto a los diluyentes empleados para la congelación de semen, diferentes investigadores informan ciertas ventajas de algunos diluyentes respecto a otros (Echegaray 2003). Por otra parte, para el caso de criopreservación de semen porcino, existe poca información sobre la utilización del azúcar trehalosa para la preparación de diluyentes, mientras que en otras especies, como los rumiantes (Aisen et al 2000) y el canino (Yildiz et al 2000) se han informado resultados positivos con la utilización de dicho azúcar.

El objetivo del presente estudio fue evaluar los cambios de la motilidad espermática en la prueba de termorresistencia empleando diferentes diluyentes para la criopreservación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un semental Pietrain x Yorkshire de dos años de edad para la extracción de semen, por medio de la técnica de mano enguantada (Martín 1982), y sólo se colectó la fracción rica en espermatozoides. La frecuencia de extracción de semen del animal fue de una vez por semana. Para la congelación de semen se utilizaron 10 eyaculados que mostraron buena calidad en el momento de la recolección, tal como habitualmente se trabaja en la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad. En este sentido, inmediatamente después que se colectó el semen, se realizaron las evaluaciones rutinarias macroscópicas, consistentes en la medición del volumen, apreciación del color y determinación de la temperatura y el pH del semen.

En el caso de las evaluaciones rutinarias microscópicas, se midió la motilidad, la concentración, la morfología y la proporción de células vivas/muertas, en los espermatozoides del semen. Los indicadores de calidad usados ad hoc en la Unidad Académica (vide supra), se muestran en la tabla 1.

Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y las morfoanomalías se usó la tinción vital de eosina-nigrosina para hacer el conteo de células en un microscopio óptico con el

objetivo de inmersión 100x, y se contaron 100 células para calcular el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro. Se realizó también la evaluación de la integridad acrosomal por medio de la triple tinción establecida por Talbot y Chacón (1981).

**Tabla 1. Indicadores de calidad para el uso de semen de cerdos**

Indicador	Valor
Motilidad, %	> 80
Motilidad individual, %	> 3
Espermatozoides vivos, %	> 80
Morfoanomalías,	< 15

Inmediatamente después de las evaluaciones hechas, el semen fue diluido 1:1 en volumen con el diluyente BTS a una temperatura de 36°C; posteriormente se enfrió lentamente hasta 15°C durante 2.5 horas. El diluyente y el plasma seminal fueron separados de los espermatozoides por centrifugación a 2 000 rpm durante 15 min.

Los sedimentos espermáticos fueron mezclados en cuatro tubos de ensayo hasta obtener una concentración de  $6 \times 10^9$  espermatozoides viables en cada fracción, y de esta manera, formar cuatro grupos para la congelación de este semen en pajillas de 0.5 mL por el método de Almid y Johnson (1988). De esta forma, los espermatozoides fueron resuspendidos en uno de los cuatro diferentes diluyentes para un enfriamiento lento hasta 5°C durante dos horas, quedando así los espermatozoides más el diluyente de enfriamiento en 5 mL en cada tubo. Posteriormente se adicionaron 5 mL del diluyente de congelación a la mezcla de espermatozoides con el diluyente de enfriamiento.

Estas células mezcladas con sus respectivos diluyentes fueron las envasadas en pajillas de 0.5 mL, que se sellaron con esferas metálicas y fueron colocadas durante 20 min en vapores de nitrógeno a 4 cm de altura del espejo de nitrógeno líquido. Los diluyentes utilizados constituyeron los cuatro tratamientos evaluados: Westendorf modificado, que contenía glucosa, según Roca et al (2003); el segundo fue el de Thilmant, basado en fructosa, de acuerdo con Thilmant (1997). En el tercer tratamiento se empleó trehalosa con glicerol, mientras que en el cuarto se usó este mismo carbohidrato pero sin glicerol. Un resumen de las características de estos diluyentes se muestra en la tabla 2, y los detalles se presentan en el anexo 1.

Los 10 eyaculados se descongelaron 15 días posteriores a su congelación, y se evaluaron las 10 pajillas de cada eyaculado en cada tratamiento. La descongelación de las pajillas se realizó en un baño de María a 56°C durante 12 segundos. Con posterioridad, las pajillas se secaron y se permitió que permanecieran durante un minuto a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), y se abrieron por el extremo donde se localizaba la esfera metálica.

De cada pajilla descongelada se tomó una gota de semen para evaluar la motilidad masal subjetivamente en la escala de 0 a 100, por microscopía óptica. Una segunda gota de semen se utilizó para hacer un frotis con eosina/nigrosina y de esta forma calcular el porcentaje de espermatozoides vivos y

muerdos, así como el porcentaje de células normales o con morfoanomalías. De las mismas pajillas se tomaron 100 µL para la evaluación de la integridad acrosomal.

**Tabla 2. Diluyentes de semen porcino usados en la prueba de termoresistencia**

Item	Westendorf		Trehalosa/glicerol	
	modificado	Thilmant	Con	Sin
Glucosa	x	-	-	-
Yema de huevo	x	x	x	x
Equex paste <sup>1</sup>	x	x	x	x
Glicerol	x	-	x	-
Fructosa	-	x	-	-
NaCO <sub>3</sub> H	-	x	-	-
Cisteina	-	x	-	-
Trehalosa	-	-	x	x
Agua <sup>2</sup>	x	x	x	x

<sup>1</sup> Para más detalles, ver anexo 1

<sup>2</sup> Destilada, después desionizada

El resto del contenido de las 10 pajillas del mismo eyaculado y tratamiento se depositaron en 30 mL de diluyente, en la proporción 4:1 en volumen, de BTS:diluyente respectivo (tabla 2), atemperado a 37°C por un tiempo total de 120 minutos, y de esta forma, evaluar la termoresistencia mediante la medida de la motilidad de las células espermáticas cada 15 minutos.

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó la técnica del análisis de varianza bajo un modelo de clasificación simple (Snedecor y Cochran 1989), mientras que se utilizó el paquete estadístico del SAS (1999) para el procesamiento digital de la información. Cuando la diferencia entre contraste entre medias resultó significativa (P<0.05), éstas se separaron por la prueba de rango múltiple de Tukey en los casos apropiados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este experimento se encontró que en la comparación general de las células espermáticas en el semen fresco y en el congelado y descongelado, se halló efecto significativo (P<0.01) para los espermatozoides vivos totales o con acrosoma y en la motilidad, a favor del semen fresco (tabla 3), pero no en los espermatozoides normales (P>0.05).

**Tabla 3. Medias globales para las variables evaluadas en semen de cerdo (en por ciento)**

n	Tipo de semen		EE ±
	Fresco	Congelado	
Normales	89.00	85.62	0.66
<b>Vivos</b>			
Totales	82.80	33.91	2.67**
Con acrosoma	77.00	22.73	1.74**
Motilidad	87.50	26.35	2.44**

\*\* P<0.01

Cuando se descongeló el semen, se encontró efecto significativo (P<0.01) de tratamiento para el porcentaje de espermatozoides vivos y vivos con acrosoma íntegro. En el

caso de espermatozoides normales, no hubo efecto significativo (P>0.05) de tratamiento. En ambos casos, el diluyente de trehalosa sin glicerol fue el que determinó los valores más bajos. Se encontró un efecto significativo (P<0.01) entre el semen fresco y el semen congelado y después descongelado, para la variable de motilidad de los espermatozoides. Los valores medios globales de motilidad obtenidos en este trabajo para el semen fresco y descongelado fueron de 87.50 y 26.35%, en ese orden. Así, se encontró una diferencia porcentual de 61.15 entre ambos tipos de semen.

Después de descongelado y diluido el semen, se hallaron diferencias significativas (P<0.01) entre tratamientos para la motilidad en la prueba de termoresistencia (tabla 4). En este sentido, los mejores resultados se obtuvieron cuando se usaron los dos diluyentes sin trehalosa, es decir, el Westendorf modificado y el Thilmant, junto con el que contenía trehalosa con glicerol, en comparación con el que no tenía este alcohol.

**Tabla 4. Influencia del tipo de diluyente en las características de los espermatozoides de semen porcino congelado y descongelado**

Diluyente <sup>1</sup>	n <sup>2</sup>	Células, %		
		Normales	Vivas totales	Vivas con acrosoma
Westendorf modificado	10	85.87	40.06 <sup>a</sup>	26.55 <sup>a</sup>
Thilmant	10	85.86	36.52 <sup>a</sup>	25.85 <sup>a</sup>
<b>Trehalosa</b>				
Con glicerol	10	85.46	38.95 <sup>a</sup>	25.16 <sup>a</sup>
Sin glicerol	10	85.19	20.12 <sup>b</sup>	13.54 <sup>b</sup>
<b>EE ±</b>	-	0.46	1.88**	1.23**

<sup>1</sup> Para detalles, ver tabla 2

<sup>2</sup> Diez eyaculados y diez pajillas por eyaculado

\*\* P<0.01

<sup>ab</sup> Medias con letras desiguales en la misma columna difieren significativamente (P<0.05) entre sí

Los datos correspondientes a la influencia del diluyente en la motilidad de los espermatozoides se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5. Influencia del tipo de diluyente en la motilidad de los espermatozoides de semen porcino congelado y descongelado**

Diluyente <sup>1</sup>	n <sup>2</sup>	Motilidad, %
Westendorf modificado	10	34.80 <sup>a</sup>
Thilmant	10	30.10 <sup>a</sup>
Trehalosa con glicerol	10	28.95 <sup>a</sup>
Trehalosa sin glicerol	10	11.55 <sup>b</sup>
<b>EE ±</b>	-	1.72**

<sup>1</sup> Para detalles, ver tabla 2

<sup>2</sup> Diez eyaculados y diez pajillas por eyaculado

\*\* P<0.01

<sup>ab</sup> Medias con letras desiguales en la misma columna difieren significativamente (P<0.05) entre sí

Inmediatamente después de descongelar y diluir el semen, el porcentaje de motilidad espermática fue inferior en el primer

minuto, incrementándose con posterioridad en los minutos 15, 30 y 45 en los cuatro tratamientos. En general, se halló efecto significativo ( $P < 0.01$ ) entre estos tratamientos en la variable de motilidad de las células, cuando fue evaluada en los diferentes tiempos de la prueba de termorresistencia. Así se manifestaron valores similares entre los tratamientos sin trehalosa o con trehalosa/glicerol, encontrándose resultados inferiores en el cuarto diluyente ensayado, consistente en trehalosa sin glicerol. Estos datos se muestran en la tabla 6. Los resultados obtenidos en esta investigación para todos los

tratamientos, excepto el de trehalosa sin glicerol, son similares a los de Bathgate et al (2006), quienes encontraron resultados cercanos al 33% de motilidad espermática, cuando el semen fue evaluado de forma subjetiva a los 10 minutos después de descongelarlo y diluirlo en medio Androhep para ser incubado a 37°C. En este sentido, los mismos autores observaron también que la motilidad de los espermatozoides, disminuyó a valores inferiores a 10% a las tres horas de incubado el semen de los cerdos.

**Tabla 6. Medias generales para la prueba de termorresistencia evaluada en el semen porcino diluido con distintos diluyentes y descongelado a distintos tiempos**

Diluyente <sup>1</sup>	Tiempo, min								
	1	15	30	45	60	75	90	105	120
Westendorf modificada	22.50 <sup>a</sup>	41.00 <sup>a</sup>	43.00 <sup>a</sup>	39.50 <sup>a</sup>	37.00 <sup>a</sup>	32.50 <sup>a</sup>	30.50 <sup>a</sup>	27.50 <sup>a</sup>	23.00 <sup>a</sup>
Thilmant	23.50 <sup>a</sup>	43.50 <sup>a</sup>	44.50 <sup>a</sup>	43.50 <sup>a</sup>	39.50 <sup>a</sup>	37.00 <sup>a</sup>	33.50 <sup>a</sup>	27.00 <sup>a</sup>	22.00 <sup>a</sup>
Trehalosa con glicerol	17.50 <sup>a</sup>	39.50 <sup>a</sup>	37.50 <sup>a</sup>	35.50 <sup>a</sup>	33.50 <sup>a</sup>	29.50 <sup>a</sup>	26.50 <sup>a</sup>	22.50 <sup>a</sup>	20.00 <sup>a</sup>
Trehalosa sin glicerol	8.00 <sup>b</sup>	19.00 <sup>b</sup>	18.50 <sup>b</sup>	17.00 <sup>b</sup>	15.00 <sup>b</sup>	11.50 <sup>b</sup>	8.50 <sup>b</sup>	7.50 <sup>b</sup>	5.50 <sup>b</sup>
EE ±	1.21 <sup>**</sup>	1.51 <sup>**</sup>	1.52 <sup>**</sup>	1.54 <sup>**</sup>	1.57 <sup>**</sup>	1.39 <sup>**</sup>	1.21 <sup>**</sup>	1.30 <sup>**</sup>	1.43 <sup>**</sup>

<sup>1</sup> Para detalles, ver tabla 2 y anexo 1

<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$

<sup>ab</sup> Medias con letras desiguales en la misma columna difieren significativamente ( $P < 0.05$ ) entre sí

Tirapicos et al (2000), obtuvieron resultados un poco inferiores a los encontrados en este estudio con tres de los cuatro diluyentes probados, ya que informaron porcentajes de motilidad de 27, 37, 35 y 29 a los 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente después de descongelar, diluir e incubar el semen a 37°C.

Gosálvez et al (2003) estudiaron tres temperaturas para la descongelación de semen de verraco (22, 42 y 50°C) en diferentes tiempos de almacenamiento en nitrógeno líquido (3, 10 y 30 días) y evaluaron el porcentaje de motilidad espermática y la morfología del acrosoma normal en los espermatozoides descongelados. Los mejores resultados los obtuvieron a los 42°C y a los tres días de congelado el semen con valores de 31.3% de motilidad; no encontraron diferencia significativa respecto a la temperatura de 50°C. Este resultado es similar al obtenido en la presente investigación, para todos los diluyentes ensayados, con excepción del de trehalosa y glicerol.

En lo que respecta a la adición de Equex STM paste, Thilmant (1997) en su trabajo de investigación halló que su adición en el diluyente para la congelación de semen de cerdo, causaba un efecto positivo, ya que mejoraba en un 10-20% los porcentajes de motilidad y acrosomas normales.

Según los resultados obtenidos, se concluye que los mejores resultados de motilidad en la prueba de termorresistencia durante los 120 minutos a 37°C en los que se realizó la evaluación en espermatozoides congelados/descongelados se obtuvieron con los diluyentes Westendorf modificado, Thilmant, y el de trehalosa con glicerol, por lo que se recomienda su uso indistintamente.

## REFERENCIAS

- Aisen, E.G., Alvarez, H., Venturino, A. y Garde, J. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram seminal diluents. *Theriogenology*, 53:1053-1061
- Almlid, T. y Johnson, L.A. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *Journal of Animal Science*, 66:2899-2905
- Bathgate, R., Maxwell, W.M.C. y Evans, G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction of Domestic Animals*, 41:68-73
- Echegaray, A. 2003. ¿Para cuándo el semen porcino congelado? *Venezuela Porcina*, 48:3-5
- Eriksson, M.B., Petersson, H. y Rodríguez-Martínez, H. 2002. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology*, 58:1065-1079
- Gadea, M.J. 2004. El uso de semen porcino congelado. *Mundo Ganadero*, 169:60-62
- Gosálvez, L.F., Vidal, A., Valdelvira, J. y Babot, O. 2003. Influencia del tiempo de crioconservación y temperatura de descongelación de dosis seminales porcinas heterospermicas con baja calidad. *Archivos de Zootecnia*, 52:81-84
- Martín, R.S. 1982. Reproducción e inseminación artificial porcina: características del esperma. Editorial Aedos. Barcelona, p 75-83

Pallas, R. y De Alba, C. 2002. Impacto de las nuevas tecnologías de inseminación artificial en la gestión de un centro de inseminación artificial. *Venezuela Porcina*, 46:15-16

Pallas, R. y De Alba, C. 2003. Impacto de nuevas tecnologías de inseminación artificial sobre la administración de un centro de IA. *Cerdos/Swine*, 64:18-22

Reed, H.C.B. 1985. Current use of frozen boar semen – future need of frozen boar semen. In: *Deep Freezing of Boar Semen*. (L.A. Johnson y K. Larsson, editores). Swedish University of Agriculture Sciences. Uppsala, p 225-237

Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X., Vázquez, J.M. y Arsenio, E.M. 2003. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 60:77-87

Roa, N., Tamasaukas, R., Silva, A. y Sánchez, J. 2005. Criopreservación de semen suino en Venezuela. Una revisión. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 4(3): versión electrónica disponible en <http://www.redvet.com>

SAS. 1999. SAS/STAT User's Guide. Release 6.12. Statistical Analysis System (SAS) Institute In Company. Cary, versión electrónica disponible en disco compacto

Snedecor, G.W. y Cochran, W.G. 1989. *Statistical Methods* (8th edition). Iowa University Press. Ames, pp

Sellés, E., Gadea, J., Romar, R., Matás, C. y Ruiz, S. 2003. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reproduction of Domestic Animals*, 38:66-72

Talbot, P. y Chacón, R.S. 1981. Observation on the acrosome reaction of human sperm "in vitro". *American Journal of Primatology*, 1:211-219

Thilmant, P. 1997. Congélation du sperme de verrat en paillette de 0.5 mL. Résultats sur le terrain. *Annales de Médecin Vétérinaire*, 141:457-462

Thilmant, P. 1998. Cryopreservation of boar semen in 0.5 mL French straws. In: *10th Meeting of Artificial Insemination*. Bruges, p 1-15

Tirapicos, N.J., Milhano, A., Charneca, R., Mendes, J. y Vila-Viçosa, M. 2000. Boar spermatozoa cryopreservation (pellets vs maxi-straws freezing), *CIHEAM-IAMZ*, 41:99-103

Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M. y Tekeli, T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54:579-585

**Anexo 1. Diluyentes de semen porcino usados en la prueba de termorresistencia**

Item	Westendorf modificado	Thilmant	Trehalosa/glicerol	
			Con	Sin
<b>Diluyente para refrigeración</b>				
Glucosa, g	2.5	-	-	-
Yema de huevo, mL	10	34	10	10
Fructosa, g	-	8.5	-	-
NaCO <sub>3</sub> H, g	-	0.15	-	-
Cisteína	-	0.015	-	-
Trehalosa, g	-	-	3.75	3.75
Agua, mL <sup>2</sup>	50	150	50	50
<b>Diluyente para congelación</b>				
Glucosa, g	2.5	-	-	-
Yema de huevo, mL	10	34	10	10
Equex STM paste, mL <sup>1</sup>	0.563	1.69	0.563	0.563
Glicerol, mL	3	9	3	-
Fructosa, g	-	8.5	-	-
NaCO <sub>3</sub> H, g	-	0.15	-	-
Cisterna, g	-	0.015	-	-
Trehalosa	-	-	3.75	3.75
Agua, mL <sup>2</sup>	50	150	50	50

<sup>1</sup> Para detalles, ver Thilmant (1997)

<sup>2</sup> Destilada, después desionizada. Volumen final