



Revista EDUCATECONCIENCIA.
Volumen 4, No. 5. Especial
ISSN: 2007-6347
Julio-Diciembre 2014
Tepic, Nayarit. México
Pp.53-64

Efecto de la temperatura en el proceso de criopreservación, sobre la motilidad progresiva del espermatozoide de cerdo

Effect of temperature on the process of cryopreservation on the progressive motility of boar sperm.

Autores:

María Guadalupe Orozco Benítez
Raúl Navarrete Méndez
Rafael Murray Núñez
Edgar Fidel Curiel Pulido.
Unidad Académica de Medicina
Veterinaria y Zootecnia
Universidad Autónoma de Nayarit.
mgorozco63@gmail.com

Efecto de la temperatura en el proceso de criopreservación, sobre la motilidad progresiva del espermatozoide de cerdo.

Effect of temperature on the process of cryopreservation on the progressive motility of boar sperm.

María Guadalupe Orozco Benítez

Raúl Navarrete Méndez

Rafael Murray Núñez

Edgar Fidel Curiel Pulido.

Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Universidad Autónoma de Nayarit.

email: mgorozco63@gmail.com

Resumen

El problema real que presenta la criopreservación no es la habilidad de la célula espermática para mantenerse viable durante el almacenaje a -196°C , sino la combinación de efectos que en el proceso del congelado-descongelado, tienen una acción dañina sobre la fisiología y morfología espermática. El daño celular que ocurre por la congelación y la descongelación se refleja en una disminución de la motilidad y daños ultraestructurales en la membrana. El objetivo fue evaluar el efecto de la temperatura sobre la motilidad progresiva de los espermatozoides de cerdos de diferentes grupos raciales. Se utilizó un semental de cada raza comercial (Yorkshire, Landrace y Duroc) se obtuvieron tres eyaculados por cada semental en forma alternada y se evaluaron por triplicado las muestras en fresco y en descongelado. Los resultados mostraron una disminución significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de espermatozoides motiles en el semen descongelado en los grupos raciales estudiados. En semen fresco el porcentaje de espermatozoides motiles no presentó diferencias significativas entre razas. Sin embargo cuando se descongeló los resultados reportaron una disminución significativa ($P < 0.05$) En la raza Yorkshire disminuyó el 49.83 %, en Landrace 54.5 %, y en la raza Duroc el 61.00 %. El porcentaje más alto de pérdida de motilidad progresiva se obtuvo en la raza Duroc.

Palabras clave. Criopreservación, espermatozoide, cerdo.

Abstrac

The actual problem with the cryopreservation is not the ability of the sperm cell to remain viable during storage at -196°C , but the combination of effects in the process,

frozen-thawed have a harmful effect on the physiology and sperm morphology. Cell damage that occurs from freezing and thawing is reflected in a decreased motility and ultrastructural damage to the membrane. The objective was to evaluate the effect of temperature on the progressive motility of pigs of different racial groups. A stallion of each commercial race (Yorkshire, Landrace and Duroc) was used were obtained three ejaculates per stallion alternately and evaluated in triplicate samples in fresh and thawed. The results showed a significant ($P < 0.05$) in the percentage of motile sperm in the semen thawed in the racial groups studied. In fresh semen the percentage of motile sperm were no significant differences between races. However when thawed the results reported a significant decrease ($P < 0.05$) in the breed Yorkshire decreased 49.83%, 54.5% in Landrace, Duroc and the 61.00%. The highest percentage loss of motility was obtained in the Duroc breed.

Keywords. Cryopreservation, sperm, pigs.

Introducción

El problema real que presenta la criopreservación no es la habilidad de la célula espermática para mantenerse viable durante el almacenaje a -196°C , sino la combinación de efectos que en el proceso del congelado-descongelado, tienen una acción dañina sobre la fisiología y morfología espermática, al pasar la célula por un intervalo de temperatura crítica de -15°C a -60°C , durante el cual se producen fenómenos que se derivan del proceso de enfriado, tales como formación de cristales intra y extra celular, deshidratación y distorsión de la membrana (Palacios, 1994; Watson, 1995).

El semen porcino difiere de otras especies de animales domésticos, ya que es producido en gran volumen, pero es extremadamente sensible al choque por frío; inmediatamente después de su colección sólo tolera niveles relativamente bajos de glicerol para su congelamiento, características que deben ser consideradas al realizar el proceso de criopreservación, ya que se sabe que esta técnica induce daños en el espermatozoide (Watson, 2000; Holt *et al.*, 2005; Meyers, 2005).

La evaluación del semen para su uso en la inseminación artificial y congelación, ha sido basada principalmente en el examen microscópico de la motilidad y morfología del espermatozoide. Sin embargo; aunque estas evaluaciones son valiosas no siempre son exactas (Ostermeier *et al.*, 2000). Diversos autores reportan que el daño producido por el

proceso de congelación-descongelación ocurre principalmente en la membrana plasmática (Watson, 1995; Noiles *et al.*, 1997; Neild *et al.*, 2003).

El daño celular que ocurre por la congelación y la descongelación se refleja en una disminución de la motilidad y daños ultraestructurales en la membrana (Johnson *et al.*, 2000).

El objetivo de este trabajo fue evaluar los daños que ocurren a los espermatozoides por la temperatura de criopreservación y su efecto sobre la motilidad y morfología.

Metodología

El presente trabajo se llevo a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, dependiente de la Universidad Autónoma de Nayarit, ubicada en la Ciudad de Compostela Nayarit., en el Km. 3.5 de la carretera de cuota Compostela-Chapalilla. Localizada geográficamente al suroeste del estado de Nayarit, a una altitud de 1021 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura media anual de 18°C, cuenta con un clima templado seco y una precipitación pluvial de 900 mm.

Animales Experimentales. En esta investigación se utilizó un semental de cada raza comercial (Yorkshire, Landrace y Duroc). Se obtuvieron tres eyaculados, de manera alterna y se evaluaron en fresco y en descongelado. Los sementales permanecieron estabulados en una corraleta individual, alimentados con la dieta de la granja y agua a libre acceso, no se realizó ningún manejo especial para los sementales.

La colección del semen se realizó en las horas más frescas de la mañana, por medio de la técnica de mano enguantada, se colectó únicamente la fracción rica en espermatozoides, en un recipiente térmico de boca ancha a 37°C, provisto de una bolsa de plástico con un filtro para separar la porción gelatinosa (Rillo-Martin, *et al.*, 1996). Se obtuvieron tres eyaculados por cada semental en forma alternada.

Inmediatamente después de obtener el eyaculado, se evaluó por medio de técnicas de laboratorio, tanto macroscópicas (volumen, color, temperatura), como microscópicas (motilidad, concentración espermática, relación de espermatozoides vivos y muertos y anormalidades), con el propósito de determinar la calidad del eyaculado (Córdova *et al.*, 1995; Hernández, 1998).

Características microscópicas: Motilidad progresiva, la evaluación de la motilidad

se realizó colocando una gota de semen sobre un portaobjetos previamente atemperado a 37°C y se cubrió con un cubre objetos, inmediatamente se observó al microscopio con el objetivo seco débil (10X), emitiendo un valor de 0 a 100% a la proporción de los espermatozoides con movimiento rectilíneo-progresivo (Rillo - Martín, *et al.*, 1996).

Concentración espermática: Para la concentración espermática, se utilizó un fotómetro: Porcine SpermaCue (Minitub®), modelo 12300/0500. Se depositó una gota de semen en la cubeta del fotómetro, misma que se introdujo en el lector y después de 10 segundos se realizó la lectura de la concentración espermática en la pantalla digital del fotómetro. (Hernández, 1998).

Relación de espermatozoides vivos y muertos. Se empleó la tinción de eosina-nigrosina (Barth y Oko, 1989). El porcentaje de espermatozoides vivos se evaluó a través de la observación de un frotis en el microscopio óptico. Se utilizó una platina caliente a 37°C y se colocó un portaobjetos limpio para atemperarlo; en éste se depositó una gota de semen conservado en baño María a la temperatura de extracción, y se agregó una gota de colorante eosina-nigrosina, también atemperada a 37°C se mezcló perfectamente con un palillo de madera, luego, con la ayuda de otro portaobjetos colocado en un ángulo de 45°, se extendió la muestra y se hizo un frotis delgado, el cual se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a la evaluación con microscopio óptico con el objetivo de (100X). Se contaron 100 células en diferentes campos ópticos y se consideró: Espermatozoides muertos, los que tiñeron su cabeza de color rosa y Espermatozoides vivos, los que no se tiñeron. (Relación de espermatozoides vivos muertos = vivos – muertos). (Hernández, 1998).

La morfología espermática normal y anormal (Normalidad = a células normales – células anormales). Se contaron 100 espermatozoides en diferentes campos ópticos, clasificando las células con base a anomalías primarias y secundarias

Sólo se congelaron eyaculados con más del 80% de motilidad, menos del 15% de morfoanomalías, y una concentración espermática de 300×10^6 por mL.

Congelación del Semen. Para la congelación se utilizó el método descrito por Westendorf *et al.* (1975) y modificado por (Bwanga *et al.*, 1990; Córdova y Pérez., 2001).

Descongelación. Después de 15 días de almacenamiento en nitrógeno líquido, se

descongelaron las pajillas que fueron extraídas del nitrógeno líquido e introducidas en un baño María a 56°C durante 16 segundos, se sacó la pajilla, y se dejó estabilizar por 10 minutos a temperatura ambiente. El contenido de la pajilla se depositó en un tubo de ensayo con 0.5 mL de diluyente B.T.S. a 37°C dentro del baño María para continuar con la evaluación de los espermatozoides.

Diseño Experimental y variables medidas. El diseño utilizado fue completamente al azar con submuestreo, considerando como submuestreo los diferentes eyaculados en cada raza.

Los datos se analizaron con un análisis de varianza, de acuerdo a la metodología descrita por Steel *et al.*(1997), empleando el paquete computacional SAS (1995), comparando las medias para establecer sus diferencias, con la prueba de Tuckey ($P < 0.05$).

Las variables que se midieron fueron: Porcentaje de motilidad progresiva y Porcentaje de espermatozoides vivos.

Resultados

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la temperatura de criopreservación sobre la motilidad progresiva que se observan en el cuadro 1 y en la gráfica 1, mostraron una disminución significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de espermatozoides motiles en el semen descongelado en los grupos raciales estudiados.

En semen fresco el porcentaje de espermatozoides motiles no presentó diferencias significativas entre razas.

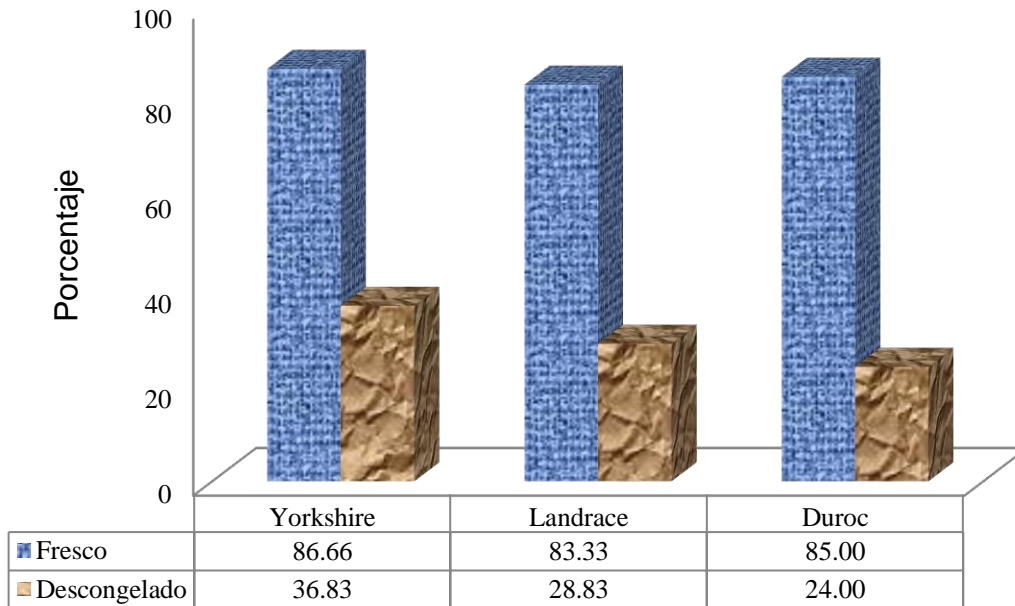
Sin embargo cuando se descongeló los resultados reportaron una disminución significativa ($P < 0.05$) En la raza Yorkshire disminuyó el 49.83 %, en Landrace 54.5 %, y en la raza Duroc el 61.00 %. El porcentaje más alto de pérdida de motilidad progresiva se obtuvo en la raza Duroc.

Cuadro 1. Medias globales para las variables motilidad y espermatozoides vivos en el espermatozoide fresco y descongelado en los diferentes grupos raciales.

| Razas | Yorkshire | | Landrace | | Duroc | |
|--------------|-----------|---------|----------|---------|--------|---------|
| Tratamientos | Fresco | Descong | Fresco | Descong | Fresco | Descong |
| Variables | | | | | | |

| | | | | | | |
|------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Motilidad | 86.66 ^a | 36.83 ^b | 83.33 ^a | 28.83 ^b | 85.00 ^a | 24.00 ^b |
| Spz. Vivos | 83.66 ^a | 42.33 ^b | 81.33 ^a | 34.33 ^b | 78.00 ^a | 31.16 ^b |

Medias con la letra diferente por fila, son diferentes significativamente en las comparaciones en cada raza (P< 0.05, Tukey).
Spz. (espermatozoides).



Grafica1. Porcentaje de motilidad progresiva del espermatozoide fresco y descongelado en los diferentes grupos raciales estudiados.

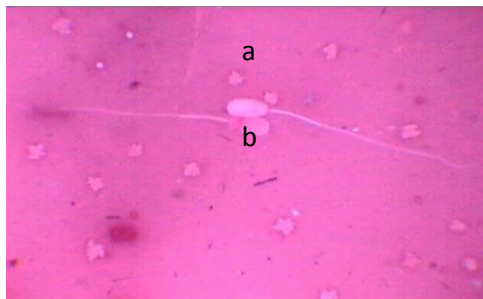
Los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la temperatura sobre los espermatozoides vivos, que se mostraron en el cuadro 1 y en la grafica2, revelaron una disminución significativa (P<0.05) de espermatozoides vivos en los grupos raciales estudiados al descongelar.

En semen fresco el porcentaje de espermatozoides vivos no presentó diferencias significativas entre razas.

El cambio de temperatura de fresco a descongelado provocó daños en la membrana plasmática de los espermatozoides y ocasionó la muerte de la célula espermática, los resultados manifiestan una disminución significativa (P<0.05) en el porcentaje de espermatozoides vivos en la razas; Yorkshire 41.33 %, Landrace 47.00 % y Duroc 46.84 %.



Gráfica 2. Porcentaje de espermatozoides vivos en semen fresco y descongelado en los diferentes grupos raciales estudiados.



a) espermatozoide vivo, b) espermatozoide muerto. teñidos con eosina-nigrosina.

Discusión.

Con respecto a la motilidad progresiva, los resultados que se obtuvieron en el presente estudio revelaron que el cambio de temperatura de fresco a descongelado provocó en los espermatozoides pérdida de la motilidad, con diferencias significativas ($P < 0.05$) entre razas. El porcentaje más alto de espermatozoides motiles se observó en la raza Yorkshire, el segundo lugar para la raza Landrace y con el porcentaje más bajo la raza Duroc. Resultados que coinciden con lo reportado por Almid y Hofmo (1996), para la raza Duroc, con el menor porcentaje de motilidad, y se coincide también con los resultados reportados para las razas Landrace y Yorkshire con los mejores porcentajes de motilidad al congelado-descongelado. (Arancibia-Salinas, *et al.*, 2007), reportaron resultados muy

similares de motilidad en semen congelado-descongelado de cerdos de las razas Yorkshire, Landrace, Duroc y Pelón Mexicano.

Flores, (2005), reportó resultados similares con disminución de motilidad espermática al congelar semen de cerdo con enfriado lento, hasta -5°C previo a la congelación. Estudios realizados en Europa y en los Estados Unidos muestran que la motilidad espermática en cerdos puede variar entre un 20 y 50 % después de la congelación, encontrándose tasas de pariciones que pueden ir del 40 al 70 %, mientras que el tamaño de camada va de 6 a 10 lechones (Almlid y Hofmo, 1996; Gadea *et al.*, 2001 2003).

El proceso de congelado-descongelado del semen ocasiona una disminución en el porcentaje de espermatozoides motiles, lo que afecta el éxito en la gestación de las cerdas inseminadas con este tipo de células (Huang *et al.*, 1999, Ruiz *et al.*, 2002, 2003; Gadea *et al.*, 2003; Roca *et al.*, 2003). Al respecto se ha mencionado que el mejor porcentaje de motilidad está asociado a un enfriamiento lento en temperaturas cercanas a 0°C (previo a la formación de hielo), ya que en experimentos donde se ha enfriado de $+5^{\circ}\text{C}$ a -5°C a tasas rápidas, se ha visto un efecto detrimental en la criosupervivencia (Bwanga *et al.*, 1991^b; Medrano *et al.*, 2002; Gadea *et al.*, 2003), por lo que se recomienda usar un enfriado lento hasta -5°C y aumentar la velocidad de enfriado por debajo de esta temperatura (Bwanga *et al.*, 1991^b; Medrano *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2003; Thurston *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2002). Por otra parte se ha estimado que el porcentaje mínimo de motilidad progresiva en el semen diluido preservado a 15°C para asegurar que se tendrá una fertilidad aceptable es de 60 % (Johnson *et al.*, 2000); en esta investigación el porcentaje de motilidad promedio en semen descongelado, fue del 30 %, y en cuanto a raza la motilidad más alta se obtuvo en la raza Yorkshire con 37 % porcentajes diferentes a los reportados por (Bwanga *et al.*, (1991^a) al congelar semen porcino en minipajillas.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides vivos, los resultados obtenidos en este trabajo revelaron que el cambio de temperatura de fresco a descongelado provocó daños en la membrana plasmática de los espermatozoides, ocasionándole la muerte. Los daños a la membrana provocaron una disminución significativa ($P<0.05$) en el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen descongelado. La raza Yorkshire mostró el porcentaje más alto de espermatozoides vivos, en segundo lugar la raza Landrace y con el porcentaje

más bajo la raza Duroc. Estos resultados coinciden con los reportados por Flores, (2005); Al congelar semen de cerdo, para evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática, utilizando tasas de enfriado lento, reportó una disminución promedio del 30 % de espermatozoides vivos en semen descongelado. Arancibia-Salinas et al., (2007), reportó porcentajes de espermatozoides vivos muy similares a los encontrados en esta investigación en espermatozoides descongelados de cerdo de las razas, Yorkshire, Landrace y Duroc utilizando la técnica de congelación de Thilmant. Martínez *et al.* (2006), al congelar semen de bovino reportaron resultados similares de disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos en semen descongelado.

De Leeuw, *et al.* (1991), reportaron que el enfriado del espermatozoide en general disminuye el porcentaje de células con membrana intacta, sobre todo cuando el enfriado se realiza en forma rápida, ya que se considera que la membrana plasmática es la estructura celular que presenta mayor daño en su integridad (Watson, 2000; Holt *et al.*, 2005; Meyers, 2005). El cambio de fluidez hace que la MP se desestabilice y sea susceptible a que ocurra una reacción acrosomal prematura, lo que trae como consecuencia que la vida de los espermatozoides se vea acortada (Ruiz *et al.*, 2002; Matás *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2006).

Conclusiones

El cambio de temperatura de fresco a descongelado provocó en los espermatozoides pérdida de la motilidad, con diferencias significativas ($P < 0.05$) entre razas.

En semen descongelado, la raza Yorkshire mostró el mayor porcentaje de motilidad, después la raza Landrace y con el menor porcentaje la raza Duroc.

El cambio de temperatura de fresco a descongelado provocó daños en la membrana plasmática de los espermatozoides ocasionando la muerte a la célula espermática, con diferencias significativas ($P < 0.05$) entre razas.

El porcentaje de espermatozoides vivos en el semen descongelado, fue mayor en la raza Yorkshire, en segundo lugar la raza Landrace y con el menor porcentaje la raza Duroc.

Referencias

- Almlid, T y Hofmo, P.O. (1996). A brief review of frozen semen application under Norwegian IA: service conditions. *Reproduction in Domestic Animals*. 31: 169-173.
- Arancibia-Salinas K; Juárez-Mosqueda M.L; Montaldo, HH; Gutiérrez, C.G; Trujillo OMG; Hernández-González, E.O y Muñoz, GR (2007). *Veterinary Res.* 1 (2): 49-56.
- Barth, A.D; Oko, R.J. (1989). *Abnormal morphology of bovine spermatozoa* Iowa State University Press.

- Iowa United States of America: 8-16.
- Bwanga, C.O. (1990). Cryopreservation of boar semen. Studies on freezing, packaging and fertilizing capacity. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Faculty of Veterinary Medicine. Uppsala, Sweden. 13–113.
- Bwanga, C.O; Einarsson, S; Rodríguez-Martínez, H. (1991a). Deep freezing of boar semen packaged in plastic bags and straws. *Reprod. Dom. Anim.* 26: 117-125.
- Bwanga, C.O; Einarsson, S; Rodríguez-Martínez, H. (1991b). Cryopreservation of boar semen. Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini and maxi straws and plastic bags. *Acta Vet. Scand.* 32: 455-461.
- Córdova A, Gutiérrez, J.F. (2002). In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5ml. straws. *Theriogenology* 57: 2119-2128.
- Córdova, I.A. y Pérez, G.J.F. (2001). Factores que determinan el éxito en la congelación de semen de verraco. Los porcicultores y su entorno. 20: 19–24.
- Córdova, I.A; Ducolomb, Y; Jiménez, I; Casas, E; Bonilla, E. y Betancourt, M. (1997). In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed boar semen. *Theriogenology*.47: 1309-1317.
- De Leeuw, F.E; Colenbrander, B.; Verkleij, A.J. (1991). The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod. Domest. Anim. Suppl.* 1: 95-104.
- Flores, G.H.F. (2005). Efecto del enfriado lento hasta -5°C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino. Tesis de Maestría en Ciencias de la producción y de la Salud Animal.
- Gadea, J.; Ruiz, S.; Sellés, E. (2003). Factores que afectan a la capacidad de congelación del semen porcino. *ITEA* 24: 330-332.
- Gadea, J.; Ruiz, S.; Sellés, E.; Romar, R.; Matás, C.; Coy, P.; Poto, A.; Peinado B. (2001). El uso de la fecundación in vitro para la evaluación de los sistemas de congelación de semen porcino. *ITEA*. 22: 799-801.
- Gadella, B.M.; López Cardozo; M. Van Golde, L.M.G. Colenbrander; B. y Gadella, T.W.J. (1995). Glycolipidos migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasmic membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa. *Cell. Sci.* 108: 935-945.
- Hernández, B.J.A. (1998). Manual; Procesamiento de semen porcino. Técnicas de congelamiento en reproducción. FAUANL. Marín N.L.
- Holt, W.V; Medrano, A; Thurston, LM; Watson, P.F (2005). The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: Insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* . 63:370-382.
- Huang, S.Y; Kuo, Y.H; Lee, W.C; Tsou, H.L; Chang, H.L; Wu, J.J, Yang, PC. (1999). Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. *Theriogenology* 51:1007-1016.
- Johnson, L.A.; Weitze, K.F.; Fiser P.; Maxwell, W.M. (2000). Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci* 62:143-172.
- Juárez, M.L. (2000). Caracterización de una nueva subestructura de la teca perinuclear del espermatozoide maduro no capacitado del cobayo. Tesis de Doctorado. CINVESTAV I.P.N.
- Kumar, S.; Millar, J.D.; Watson, P. (2003). The effect of cooling rate on the survival of criopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 46:246-253.
- Martinez, O.; Juarez-Mosqueda, M. L.; Hernández, Espinoza, J.; Valencia, J. (2006). Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology* 66:1969-1975.
- Matás, C.; Marco, Ma.; Gadea, J. (2002). The effect of different treatments of fresh and frozen semen on acrosome reaction. *Reprod. Dom. Anim.* 37: 243. Abstr.
- Medrano, A.; Watson, P.F.; Holt, W.V. (2002). Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reprod* 123:315-322.
- Meyers, S.A. (2005). Spermatozoa response to osmotic stress. *Anim. Reprod. Sci.* 89:57-64.
- Neild, D.M.; Gadella, B.M.; Chaves, M.G.; Miragaya, M.H.; Colenbrander, B.; Agüero, A. (2003). Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59:1693-1705.

- Noiles, E.E.; Thompson, K.A.; Storey, B.T. (1997). Water permeability of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. *Cryobiology*. 35:79-92.
- Ostermeier, G.; Saitor, R.; Susko, J.L.; Parrish, J.J. (2000). Bull fertility and sperm nuclear shape. *Ag Biothenet*. Vol 2. September ABN055.
- Palacios, A.A. (1994). Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Vet. Méx.* 25:207-210.
- Rillo, Martín S; Martínez, E; García, A.C. De Alba, C. (1996). Boar semen evaluation in practise. *Reprod. Dom. Anim.* 31:519-526.
- Roca, J.; Carvajal, G.; Lucas, X.; Vazquez, J.M.; Martinez, E.A. (2003). Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*. 60:77-87.
- Ruiz, S.; Gadea, J.; Sellés, E.; Marco, Ma.; Segundo, M. (2003). Inseminación con semen congelado porcino: deposición cervical e intrauterina. *ITEA*. 24: 333-335.
- Ruiz, S.; Sellés, E.; Gadea, J.; Marco, Ma.; Murgas, L. (2002). Effect of freezing rate on boar semen frozen: preliminary results of A.I. *Theriogenology*. 57: 480. Abstrac.
- Steel, R.G.W.; Torrie, J.H. y Dickey, M. (1997). Principles and procedures of statistics. A. Biometrical Approach. Mac. Graw-Hill.
- 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. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen *Anim. Reprod. Science*. 61:481-492.
- Westendorf, P.; Richter, L.; Treu, H. (1975). Zur Tiefgefrierung von Ebesperma. Laboround Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletenverfahren. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr* 82:261-267.