

**Efecto de la criopreservación sobre las
características microscópicas del
espermatozoide porcino**

Estefanía Erazo Falconi

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Efecto de la criopreservación sobre las características
microscópicas del espermatozoide porcino**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el grado
Académico de Licenciatura

Presentado por:

Estefanía Erazo Falconi

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

La autora concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Estefanía Erazo Falconi

Honduras
Diciembre, 2007

Efecto de la criopreservación sobre las características microscópicas del espermatozoide porcino

Presentado por:

Estefanía Erazo Falconi

Aprobado:

Rogel Castillo, M.Sc.
Asesor principal

Miguel Vélez, Ph.D.
Director Carrera Ciencia
y Producción Agropecuaria

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

John J. Hincapié, Ph.D.
Coordinador Área Temática
Zootecnia

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi todo mi guía por nunca abandonarme y darme fuerzas todos los días.

A mis padres Roberto Erazo, Maria del Carmen Falconi quienes con su inmenso amor todo el tiempo me estuvieron apoyando y dando fuerza.

A mis hermanas Maria José y Maria Belén por su constante animo y apoyo a las cuales admiro mucho por todo lo que son, gracias por enseñarme y aconsejarme.

A Gabriela Martínez mi amiga en clases y de habitación gracias por tu apoyo en las buenas y en las malas.

A Israel, Bianca, Adrián, Fabián, Sebastián, Bolívar y a todos los que a pesar de la distancia siempre estuvieron ahí.

A Marco por ser mi apoyo mi compañía y compartir dos años de mi vida en la escuela.

A todos los colegas por estar ahí en todo momento Gracias por todo.

Al Ing. Castillo por brindarme su apoyo y conocimientos durante toda la realización de la tesis.

Al Dr. Hincapié por su apoyo, su amistad, paciencia y conocimientos brindados durante la tesis.

RESUMEN

Erazo, Estefania. 2007, Efecto de la criopreservación sobre las características microscópicas del espermatozoide porcino. Proyecto Especial Ingeniero Agrónomo. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras.

Ciertas características de los eyaculados porcinos, como la dependencia de la motilidad espermática a la temperatura y la aglutinación espermática, influyen negativamente las posibilidades de aplicar comercialmente la criopreservación. El objetivo del estudio fue evaluar los cambios en los parámetros microscópicos que presenta el espermatozoide porcino al ser criopreservado. El estudio se llevó a cabo en Zamorano, se utilizó el semen de cinco verracos; se evaluó las características microscópicas: Motilidad en Masa (MM), Motilidad Individual (MI), morfología y viabilidad entre semen fresco y poscongelado. Se encontró diferencia ($P < 0.05$) en MM, MI y viabilidad entre semen fresco y poscongelado con valores de 70.7 y 12.6%; 67.5 y 12.28% ; 64.1 y 16.5% respectivamente; la morfología de cabeza y cuello no se vio afectada ($P > 0.05$), mientras que la de cola ($P < 0.05$) presentó valores de 30.08 y 34.9% para semen fresco y poscongelado respectivamente. El cerdo PIC-166 presentó el mejor comportamiento para MM, MI, viabilidad y morfología de cola. Se concluye que el proceso de criopreservación disminuye drásticamente la MM, MI, viabilidad e incrementa las anomalías de cola en la especie porcina.

Palabras clave: Morfología, motilidad en masa, motilidad individual, PIC-166, viabilidad.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Contenido.....	vii
Indice de cuadros.....	viii
INTRODUCCION.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	2
RESULTADOS Y DISCUSION.....	7
CONCLUSIONES.....	10
RECOMENDACIONES.....	11
LITERATURA CITADA.....	12

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Evaluación del eyaculado de cerdo según la motilidad en masa.....	4
2. Clasificación de la calidad del movimiento individual progresivo de los espermatozoides.....	4
3. Motilidad en masa de semen fresco y poscongelado por verracos.....	8
4. Motilidad individual de semen fresco y congelado por verracos.....	8
5. Viabilidad de espermatozoides en fresco y poscongelado por verracos.....	9
6. Anormalidades primarias de cabeza y cuello de semen fresco y poscongelado.....	9
7. Anormalidades primarias de cola en semen fresco y pos congelado por verracos.....	10

INTRODUCCION

La Inseminación Artificial (I.A.) en cerdos, que era minoritaria a finales de los años 80, está implementada en muchas explotaciones, estimándose en un 75% en Europa. Esto se ha logrado en gran medida, por el buen funcionamiento de la técnica de inseminación artificial con semen refrigerado, cuyos resultados superan a los obtenidos por la monta natural en la mayor parte de los casos (García Casado 2001).

El éxito de la fecundación depende de: el intervalo inseminación – ovulación, la cantidad fecundante de los espermatozoides y el lugar de deposición (Revista Porci 2005).

Ciertas características de los eyaculados porcinos, como la dependencia de la motilidad espermática con la temperatura y la aglutinación espermática, influyen negativamente las posibilidades de extender la aplicación comercial de la inseminación artificial con semen conservado.

Las prácticas corrientes de conservación en la producción de dosis de semen porcino para inseminación artificial incorporan un periodo de enfriamiento que permite llegar solamente a una temperatura constante de 16°C, ya que con semen enfriado a temperaturas menores, no se han obtenido buenos resultados de inseminación (Cisale *et al* 2006).

Si bien la congelación de semen no es una técnica nueva, recientes investigaciones han logrado avances en la congelación de semen. El interés por mejorar dicha tecnología se debe al riesgo de desabastecimiento que supondría una eventual epidemia, y sería vital importar y exportar semen de verracos de alta calidad genética (Echegaray 2001).

El sistema y el protocolo de congelación afectan la sobrevivencia espermática. La tasa de congelado modifica la dinámica de la formación de hielo y donde éste se forma (intra o extracelular) ya que la formación intracelular de hielo debe evitarse para reducir el daño celular. El sistema de envasado del semen también es importante porque permite o interfiere con la disposición eficiente del calor (Medrano y Holt 1998).

Basados en lo anterior se realizó una investigación en Zamorano la cual tuvo como objetivo general evaluar los cambios en los parámetros microscópicos que presenta el espermatozoide porcino al ser criopreservado, y como objetivos específicos determinar los cambios en la motilidad en masa e individual, morfología y la viabilidad del semen porcino pre y poscongelado.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó de mayo a julio de 2007 en el laboratorio de reproducción de Zamorano, ubicado a 32 km. al sureste de Tegucigalpa, Honduras, a una elevación de 800 msnm, con una temperatura media anual de 24 °C y con una precipitación media anual de 1100 mm.

Se utilizaron cinco verracos de las razas: Landrance (1), Yorkshire (2), Duroc (1) y cruce comercial (1) de la unidad de cerdos de Zamorano, con edades comprendidas entre uno y tres años con cuatro repeticiones cada verraco.

Para la recolección del semen se utilizó la técnica de la mano enguantada con la ayuda de un potro- maniquí artificial. El semen fue recolectado en un recipiente isotérmico (37°C), teniendo cuidado de desechar la primera fracción (pre-espermática) (Poulenc 1997) y traslado inmediatamente al laboratorio de reproducción animal.

Los parámetros macroscópicos analizados fueron: Volumen, color, olor, pH. El volumen se midió en un vaso de precipitación esterilizado y debía ser mayor a 100 mL, para ser evaluado. Se evaluó semen de color lechoso, grisáceo lechoso o amarillo cremoso únicamente (Holy 1987), ya que un color rojizo, rosado o amarillentos pueden indicar contaminación por sangre u orina. En cada muestra se evaluó el olor evitando seleccionar los que tienen olor a pútrido ya que son indeseables pueden confirmar enfermedades del testículo y de las glándulas sexuales accesorias o del prepucio (Holy 1987). Para medir el pH se utilizó papel tornasol; el pH ideal está alrededor de 7.4 ± 0.2 (Gadea 2003). La temperatura de todos los utensilios que estuvieron en contacto con el semen fue de 37 °C.

A nivel microscópico se analizaron los siguientes parámetros: Motilidad en Masa (M.M.), Motilidad Individual (M.I.), morfología (anormalidades primarias).

Motilidad en Masa (M.M.) Para evaluar esta característica tanto en fresco como en pos congelado se colocó una gota de 10uL y se observó al microscopio a 10X: se evaluó de acuerdo con la escala de Holy (1987)(Cuadro 1)

.Cuadro 1. Evaluación del eyaculado de cerdo según la motilidad en masa.

Motilidad (%) en Masa (MM)	Descripción	Espermatozoides vivos
MM 0	En el campo microscópico no se encuentran remolinos. Los espermatozoides están sin movimiento, o muy débiles.	< 10
MM +	Los remolinos son muy lentos y suaves y la vitalidad está muy disminuida o hay gran cantidad de espermatozoides muertos.	10 – 40
MM ++	Movimientos masivos bien definidos, formación rápida de remolinos.	40 – 60
MM +++	Movimiento masivo muy intenso con formación y desaparición rápida de remolinos.	> 60

Fuente: Holy (1987); adaptado por el autor

MM = Motilidad en masa

Motilidad Individual (M.I.) Para evaluar la M.I. se colocó 20uL de semen fresco en 80 uL de Solución Salina Fisiológica (0.9% NaCl) (SSF) y se cubrió con un cubre objeto, se observó en microscopio a 40X. Para evaluar esta característica se utilizaron los tipos de movimientos descritos por Lamothe (1997), siendo los movimientos más comunes en los espermatozoides: movimiento progresivo rectilíneo en el cual las células espermáticas se mueven rápidamente en línea recta hacia delante; este movimiento es el ideal, cualquier otro movimiento diferente se consideró anormal. Movimiento circular, las células muestran un movimiento en círculo, debido a movimientos del cuello y la cola. Movimiento pendular, las células espermáticas muestran movimientos espasmódicos como de serpiente, sin progresión de lugar. El porcentaje de células con movimiento individual progresivo presente en la muestra se clasificó de acuerdo con la escala propuesta por Zemjanis (1987) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación de la calidad del movimiento individual progresivo de los espermatozoides

Descripción	%
Muy buena	80 - 100
Buena	60 - 80
Regular	40 - 60
Pobre	20 – 40

Fuente: Zemjanis (1987)

Viabilidad. Para determinar la viabilidad se utilizó el método de Blom, el cual consiste en la tinción, con eosina al 5% y nigrosina al 10% para diferenciar los espermatozoides vivos y muertos, la cabeza de los espermatozoides muertos se tiñe de rosado, mientras que los espermatozoides que se están muriendo se tiñe solo la parte caudal (Holy 1987). Se usó solución acuosa de eosina: nigrosina al 1% calentada a la temperatura del semen (37°C) antes de ser utilizada; en una placa se depositó una gota de semen, se colocó la eosina se mezcla y se añadió rápidamente la nigrosina, se hizo un frotis y se llevó al microscopio para hacer el conteo que no duró más de un minuto ya que a medida que pasa el tiempo se colorean más espermatozoides debido a la mortalidad, dificultando el conteo.

Anormalidades. Un eyaculado normal no debe contener más del 10% de espermatozoides con alguna anomalía, lo cual debe ser valorado rutinariamente después de la recolección y antes de preparar las dosis para Inseminación Artificial (IA), para ello se emplean técnicas de tinción totales que permiten observar el aspecto general de los espermatozoides (García *et al.* 1994).

Morfología. Se utilizó la técnica descrita por Gonzáles y Muñoz (2002), la cual consiste en diluir el semen fresco con Solución Salina Fisiológica (0.9% NaCl)(SSF) en proporción de 20:80 (semen: SSF) luego se realizó el frotis y se dejó secar a 37 °C, posteriormente se cubrió el frotis con rojo neutro durante un minuto, se lavó con agua destilada y se dejó secar, se aplicó azul de metileno en la placa por un minuto, nuevamente se lavó con agua destilada y se dejó secar, para luego ser observado al microscopio a 40X. Se usó rojo neutro al 10% para la morfología de cabeza y azul de metileno al 10% para el acrosoma y cola. Las anomalías que se evaluaron fueron:

Anormalidades primarias: Cabeza
Cuello
Cola

Concentración: La concentración es el número de espermatozoides por unidad de volumen de eyaculado. La valoración de este parámetro es fundamental ya que junto con el volumen del eyaculado determinan el número de dosis seminales para la IA. Se emplean varios métodos, en el presente estudio se utilizó una solución espermaticida para la inmovilización de los espermatozoides al 5% de formalina en Solución Salina Fisiológica al 0.9% en diluciones con el esperma de 1:100. Previamente se desinfectaron todos los utensilios y se colocó una gota de semen en el retículo de la cámara de Neubauer que se dejó por unos cinco minutos para que precipiten los espermatozoides. El conteo no tardó más de un minuto y se realizó directamente en el microscopio contando los espermatozoides de cinco cuadros grandes del rayado de la cámara de Neubauer en ambos lados, solo se realizó para semen fresco y no para pos congelado.

Para calcular el número dosis por IA por eyaculado se utilizó la fórmula (Castillo 2006):

$$\text{No de dosis (N)} = \frac{A \times V}{5 \times 10^9}$$

N = Número de dosis

V= Volumen del eyaculado

A= Espermatozoides contados en 40 cuadros de la cámara de conteo.

La temperatura del diluyente fue similar a la del semen (32°C), la dilución fue 1:3 (semen:diluyente).

La técnica que se usó para la congelación fue la de Westendorf (1975) citado por García (2001).

- Obtención de la fracción espermática del eyaculado
- Dilución 1/3 con diluyente de refrigeración a 32°C.
- Equilibrar durante 90 minutos a temperatura ambiente (20-22°C.)
- Equilibrar a 15°C durante 120 minutos
- Centrifugación a 800 x g durante 10 minutos en viales con 5×10^9 spz
- Eliminación del plasma seminal
- Dilución hasta 3.5 mL con Lactosa –Yema (A)
- Equilibración durante 120 minutos para disminuir a 5°C.
- Dilución hasta 5 mL con Lactosa- Yema + Glicerol + OEP (B)
- Congelación inmediata en pajuelas de 0.5 ml en vapor de nitrógeno a una altura de 5 cm. durante 20 minutos.
- Introducción en nitrógeno líquido.

Para la descongelación cada pajuela se introdujeron en baño maría a 35°C durante 60 segundos (Perezcano-Fernández 1978). Se descongelaron cinco pajuelas de 0.5 mL. de cada toma/verraco.

Composición de Lactosa – Yema (A):

Lactosa.....	8.8 g.
Agua Destilada.....	Hasta 80 mL
Yema de huevo.....	20 mL.

Composición de Lactosa- Yema + Glicerol (B):

Lactosa-Yema.....	95 mL
Glicerol.....	5 mL

Las variables analizadas para semen fresco y pos congelado fueron: Porcentaje de motilidad en masa, motilidad individual, anomalías y viabilidad.

Para el análisis de los datos, se utilizó el programa Statistical Analysis Systems (SAS 2002), por medio de un diseño de bloques completamente al azar (BCA) en arreglo factorial 2×5 (tipo de semen \times verraco) Se utilizó un Modelo Lineal General (GLM), con una separación de medias y la prueba SNK. Los valores porcentuales fueron corregidos utilizando la función arc-seno. El valor de significancia exigido fue ≤ 0.05 .

RESULTADOS Y DISCUSION

Motilidad en Masa (M.M.) Hubo diferencia ($P < 0.05$) entre semen fresco y congelado (70.72 y 12.62% respectivamente) así como entre verracos. El verraco que mayor motilidad poscongelado presentó fue PIC-166 (Cuadro 3). Para considerar que un semen es congelable debe tener como mínimo exigido un 35% de motilidad poscongelado (Echegaray 2001), o sea que ninguno de los verracos cumple con este parámetro. Esto se atribuye a que en la fase de criopreservación los espermatozoides sufren cambios térmicos lo que causa un daño intra e inter celular causando la muerte del espermatozoide.

Cuadro 3. Motilidad en masa del semen fresco y poscongelado por verracos.

Nombre	Motilidad en Masa (%)	
	Fresco	Poscongelado
Y-160	65.0 ± 12.99 ^b	13.4 ± 4.71 ^b
PIC-166	81.2 ± 6.29 ^a	20.4 ± 5.79 ^a
D-TEQUILA	73.7 ± 4.78 ^b	11.3 ± 2.50 ^b
Y-273	66.2 ± 11.08 ^b	12.0 ± 2.16 ^b
L-AB	67.5 ± 5.00 ^b	10.0 ± 4.08 ^b

Valores en la misma columna con diferente letra existen diferencia ($P < 0.05$).

Estos resultados difieren de los encontrados por Bwanga *et al.* (1990) quienes obtuvieron un 32% en M.M. poscongelado utilizando viales de 0.25 mL. El verraco que presenta buena motilidad en masa en fresco es el que mejor resultados obtiene en el poscongelado.

Motilidad Individual (M.I.) Hubo diferencia ($P < 0.05$) entre semen fresco y congelado (67.5 y 12.28 respectivamente) así como entre verracos. El verraco que mayor M.I. presentó fue PIC-166 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Motilidad individual del semen fresco y congelado por verracos.

Nombre	Motilidad Individual (%)	
	Fresco	Poscongelado
Y-160	60.0 ± 18.2 ^b	12.5 ± 5.0 ^b
PIC-166	80.0 ± 8.1 ^a	17.0 ± 4.7 ^a
D-TEQUILA	70.0 ± 8.1 ^b	10.0 ± 0.0 ^b
Y-273	62.5 ± 17.0 ^b	11.2 ± 2.5 ^b
L-AB	65.0 ± 5.7 ^b	10.7 ± 2.9 ^b

Valores en la misma columna con diferente letra existen diferencia ($P < 0.05$).

Los resultados obtenidos son inferiores a las reportadas por Galo y Uclés (2003) quienes obtuvieron 29% de M.I. en semen poscongelado e igualmente inferiores a las conclusiones de Echegaray (2001) de un valor aceptable es de 30-40% de M.I. y solo un 20-30% de los verracos pueden tener características de semen congelable llegando a ser donantes con resultados satisfactorios.

Viabilidad. Hubo diferencia ($P < 0.05$) entre semen fresco y poscongelado (64.1 y 16.5% respectivamente). El verraco que mejor viabilidad presentó y menor mortalidad poscongelado fue PIC-166 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Viabilidad de los espermatozoides en fresco y poscongelado por verracos.

Nombre	Fresco (%)		Poscongelado (%)	
	Esp. Vivos	Esp. Muertos	Esp. Vivos	Esp. Muertos
Y-160	54.9 ± 4.1 ^a	44.1 ± 10.7 ^a	12.1 ± 2.9 ^a	87.9 ± 2.9 ^a
PIC-166	65.1 ± 3.8 ^a	34.9 ± 3.8 ^a	23.9 ± 2.5 ^b	76.1 ± 2.5 ^b
D-TEQUILA	67.7 ± 5.6 ^a	32.3 ± 5.6 ^a	16.6 ± 5.0 ^a	83.4 ± 5.0 ^a
Y-273	63.8 ± 10 ^a	38.2 ± 6.4 ^a	15.2 ± 4.8 ^a	84.8 ± 4.9 ^a
L-AB	69.0 ± 4.2 ^a	31.0 ± 4.2 ^a	14.7 ± 4.9 ^a	85.3 ± 4.9 ^a

Valores en la misma columna con diferente letra existe diferencia ($P < 0.05$).

Satorre *et al.* (2005) reportaron hasta un 40% de viabilidad cuando se aplica vitamina E en el diluyente de congelamiento, siendo mayores a las obtenidas en este experimento por la relación directa que existe entre motilidad y viabilidad.

Morfología. No hubo diferencias ($P > 0.05$) en anomalías de cabeza y cuello ni entre verracos ni entre repeticiones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Anomalías de la cabeza y del cuello del semen fresco y poscongelado.

Nombre	Morfología(%)			
	Cabeza		Cuello	
	Fresco	Poscongelado	Fresco	Poscongelado
Y-160	14.6 ± 5.4	27.1 ± 8.3	11.3 ± 12.7	14.1 ± 2.3
PIC-166	23.9 ± 8.6	32.8 ± 8.9	16.8 ± 10.9	18.0 ± 2.4
D-TEQUILA	15.0 ± 8.0	31.3 ± 9.0	10.1 ± 7.2	11.3 ± 3.1
Y-273	31.1 ± 12.2	31.8 ± 7.2	20.3 ± 12.3	22.8 ± 2.2
L-AB	23.1 ± 13.4	30.4 ± 6.7	11.8 ± 8.7	13.5 ± 1.7

En todos los casos se encontró una anomalía menor de 60% que es el máximo aceptable (Ruiz *et al.* 1990). Las diferencias que existen entre la morfología del espermatozoide se debe a las propiedades que tiene la membrana espermática al ser

susceptible al estrés de la congelación – descongelación de cada individuo (Medrano y Holt 1998).

En anormalidades de la cola hubo diferencias ($P < 0.005$) entre verracos y entre semen fresco y poscongelado (30.08 y 34.98 respectivamente) (Cuadro 7). En todos los casos se obtuvo una anormalidad menor al 60%, que es el máximo aceptable (Ruiz *et al.* 1990) Las diferencias en la morfología de los espermatozoides se debe posiblemente a las diferencias en susceptibilidad que tiene la membrana espermática al estrés de la congelación- descongelación de cada individuo (Medrano y Holt 1998).

Cuadro 7. Anormalidades primarias de la cola en semen fresco y congelado por verracos.

Nombre	Morfología Cola (%)	
	Fresco	Poscongelado
Y-160	37.9 ± 10.0 ^b	48.8 ± 20.8 ^b
PIC-166	21.8 ± 13.7 ^a	30.0 ± 15.0 ^a
D-TEQUILA	27.8 ± 16.7 ^b	30.9 ± 6.8 ^b
Y-273	21.5 ± 4.0 ^b	34.3 ± 10.6 ^b
L-AB	41.4 ± 7.9 ^b	41.8 ± 4.1 ^b

Valores en la misma columna con diferente letra existe diferencia ($P < 0.05$).

Se obtuvo una correlación negativa entre viabilidad y anormalidades de cabeza y cola ($r = -0.39$; $P = 0.013$ y $r = -0.20$; $P = 0.21$ respectivamente), lo cual significa que a menor número de anormalidades del semen la viabilidad aumenta ya que el esperma normal puede soportar mejor los cambio térmicos.

CONCLUSIONES

- El proceso de criopreservación disminuyó drásticamente la motilidad en masa e individual.
- La morfología es afectada por la criopreservación siendo las anormalidades de cola las que mayor incremento presentaron.
- La viabilidad se disminuyó severamente cuando el semen porcino fue sometido a la criopreservación.

RECOMENDACIONES

- Realizar futuras investigaciones utilizando vitamina E en el diluyente para la congelación.
- Disponer de una centrífuga térmica para evitar cambios bruscos de temperatura en los espermatozoides.

LITERATURA CITADA

- Bwanga. C; de Braganca M. M; Einarsson, S; Rodríguez M.H. 1990. Cryopreservation of boar semen in mini and maxi straws. Uppsala, Sweden. 58 p.
- Castillo, R. 2006. Producción de cerdos. inseminación artificial en cerdas. Tegucigalpa, Honduras. pp 58-59.
- Cisale. H; Fernandez, H; Rovolta, M; Ortega, G; Domínguez, J; Gledhilp, B; 2006. Inseminación artificial con semen de cerdo mejorado (en línea): (fecha de consulta: 20 de junio 2006). Disponible en: www.porcicultura.com/articulos/ia/articulo.php?tema=iar028
- Echegaray, A. 2001. Para cuando el semen porcino congelado? (en línea): (fecha de consulta: 20 de junio de 2006). Disponible en: www.porcicultura.com/articulos/ia/semenconge.htm
- Gadea, J. 2003. Los diluyentes de inseminación artificial porcina (en línea): (fecha de consulta 3 de mayo del 2007). Disponible en: www.agroinformacion.com/leer-contenidos.aspx?articulo=1054
- Galo, H; Ucles, D. 2003. Congelación de semen de cerdo y evaluación de la calidad biológica pos descongelado: Tesis Ing. Agr. Honduras- Zamorano, Escuela Agrícola Panamericana. 15 p.
- García Casado P. 2001. XXIV Curso Internacional de reproducción animal: Reproducción porcina. Madrid, España. 76.
- Gonzáles, B; Muñoz, K. 2002. Determinación de la calidad biológica del semen congelado de la unidad de ganado lechero y doble propósito en Zamorano, Honduras. Tesis Ing. Agr. Valle del Yeguaré, Honduras. 34 p.
- Holy, L. 1987. Biología de la reproducción bovina, Introducción al proceso del examen de la fertilidad de la hembra y el macho. Trad. R. Barnet. 2 ed. La Habana. Ed. Científico-Técnica. 344 p.
- Lamothe, C.1997. Características del eyaculado. Tabasco, México: Memorias del VI curso de actualización en reproducción animal. pp12-24.

Medrano, A; Holt W. 1998. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado – descongelado (en línea): (fecha de consulta 5 de septiembre de 2006). Disponible en :

www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/az2.htm

Fernandez, P. 1978. Cryopreservation of boar semen studies on freezing, packaging and fertilizing capacity. Uppsala Ed. 1990. 34p.

Poulenc. J. 1997. Manejo reproductivo. Manual del porcicultor. Trad. Callen Antonio. 5 ed. Zaragoza, España pp 246-248.

Revista Porci. 2005. Actualidades en inseminación artificial Porcina. (en línea): (fecha de consulta: 22 de Junio de 2006). Disponible en:

www.porcicultura.com/articulos/ia/articulo.php?tema=iar025

Ruiz, S; Gadea, J; Poto, A; Coy, P; Romar, R; Campos, I; Peinado, B; Sellés, E; 1999. Validación de Crioprotectores en la congelación seminal porcina mediante fecundación in vitro (FIV) Lugo, España: II Congreso Ibérico de Reproducción Animal. pp 382-384.

SAS. 2002. User Guide. Statistical Analysis System Inc., Carry, NC. Version 9.01.329 p.

Satorre, M; Breininger, E; Beconi, M; 2005. Evaluación de parámetros de calidad seminal en semen porcino criopreservado con vitamina E. Universidad de Buenos Aires. (en línea). Disponible en: www.fvet.uba.ar/invet/suplemento3j.pdf

Zemjanis, R. 1987. Reproducción Animal. Diagnósticos y técnicas terapéuticas. Trad. D. Pacheco. D.F. México. Ed. LIMUSA, S.A. 253 p.