

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE DOS CURVAS DE CONGELACIÓN DE SEMEN PORCINO. RESULTADOS PRELIMINARES

Comparison of the effect of two freeze-thawing curves for porcine semen. preliminary results

Mariana Caldevilla, Alejandro Ferrante, Carlos Pendola, Marcelo Miragaya

Universidad de Buenos Aires,
Facultad de Ciencias
Veterinarias, Cátedra de
Teriogenología, Instituto de
Investigación y Tecnología en
Reproducción Animal,
Argentina.

Correspondencia:
Chorroarín 280, Ciudad
Autónoma de Buenos Aires,
Argentina. Código Postal
1427.

E-mail:
marianacaldevilla@gmail.com

RESUMEN

Los resultados conseguidos en fertilidad y tamaño de la camada utilizando inseminación artificial con semen congelado-descongelado porcino, distan mucho de los resultados obtenidos por monta natural y/o inseminación con semen refrigerado. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos curvas de congelación y dos crioprotectores en la criopreservación de semen porcino. Se utilizaron seis machos de fertilidad comprobada ($n=6$, $r=2$). El semen se obtuvo mediante la técnica de mano enguantada y se transportó hasta el laboratorio a 17 °C diluido en medio Androstar® plus. Se centrifugó 15 minutos a 800 g y se rediluyó en medio: A) DMF 5%, lactosa 11%, yema 20%, Equex 0,5% o B) glicerol 3%, lactosa 11%, yema 20%, Equex 0,5%. Se envasó en pajuelas de 0,5 ml a una concentración de 300 millones de espermatozoides/ml y se realizó el congelamiento siguiendo una curva lenta tradicional de Westendorff modificada o una curva rápida. El descongelamiento se realizó a 37 °C durante 1 minuto. Se evaluaron los parámetros cinéticos de la movilidad espermática utilizando un sistema CASA (ISAS v1, Proiser®, España). Se evaluó la viabilidad y el estado acrosomal con la tinción de FICT-PNA/PI. Se realizó un diseño factorial de 2 factores con dos niveles cada uno, bloqueando por macho. No se observó interacción entre los dos factores. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las curvas ni entre los crioprotectores en ninguno de los parámetros cinéticos evaluados ni en ninguno de los patrones observados con la tinción de FITC-PNA/PI. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las curvas ni entre los crioprotectores en ninguno de los patrones de morfo-anomalías evaluados en el semen porcino pos-descongelado. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la curva rápida sería una elección más práctica, rápida, accesible para realizar a campo en cualquier granja porcina.

Palabras clave: semen, porcino, criopreservación, glicerol, dimetilformamida

ABSTRACT

Results obtained in fertility and litter size using frozen-thawed porcine semen are far from those obtained with natural service or artificial insemination of cooled semen. The objective of this study was to evaluate freeze-thawing of porcine semen comparing the traditional slow method to a rapid curve of temperature descent, using two cryoprotectants. Six males of proven fertility ($n=6$, $r=2$) were used. Semen was obtained using the gloved-hand technique and was transported to the laboratory at 17 °C diluted in Androstar® plus. Samples were centrifuged 15 minutes at 800 g and re-diluted in: a) 5% dimethylformamide, 11% lactose, 20% egg yolk, 0.5% Equex or b) 3% glycerol, 11% lactose, 20% egg yolk, 0.5% Equex. The semen was frozen in 0.5 ml straws up to a final concentration of 300×10^6 sperm /ml using either a modified slow traditional Westendorff curve or a rapid curve. In both cases thawing was carried out at 37 °C during 1 minute. Kinetic motility parameters were evaluated using a CASA system (ISAS v1, Proiser®, Spain). Sperm viability and acrosome status were evaluated using the FITC-PNA/PI stain. The results were analyzed using a factorial design (analysis of variance) with two factors, with two levels for each one and using the male as a blocking factor. No interaction was observed between the parameters. No significant differences ($p > 0.05$) were observed between curves or between cryoprotectants neither in any of the kinetic motility parameters evaluated nor in sperm viability and acrosome status. No significant

differences ($p > 0.05$) were observed between curves or between cryoprotectants in sperm morphology in thawed porcine semen. Taking into account the results obtained, the rapid curve would be the practical choice as it is, faster and more manageable for fieldwork in any pig farm.

Keywords: semen, porcine, cryopreservation, glycerol, dimethylformamide.

INTRODUCTION

El congelamiento de semen es una biotecnología que ha permitido preservar material genético durante muchos años, intensificando el mejoramiento genético y permitiendo el uso más eficiente de los reproductores de alto valor. En el año 1949 el equipo del Dr. C. Polge en Cambridge (Reino Unido), utilizó por primera vez con éxito el glicerol como agente crioprotector para congelar espermatozoides de bovinos. Este hecho supuso un espectacular desarrollo de los sistemas de congelación de todos los tipos de células y la paulatina implantación del uso de semen congelado en la inseminación artificial bovina. Por el contrario, en la especie porcina, la aplicación inicial de las técnicas de congelación espermática no logró el éxito esperado (Gadea, 2004). Veinte años después, en 1970 también en Cambridge, se obtuvieron las primeras camadas porcinas a partir de semen congelado mediante la deposición del mismo a nivel uterino mediante una laparotomía (Polge *et al.*, 1970). Sin embargo los resultados conseguidos en fertilidad y tamaño de la camada utilizando inseminación artificial con semen congelado-descongelado porcino, distan mucho de los resultados obtenidos con la monta natural y de los resultados obtenidos por inseminación con semen refrigerado que rondan un 90%. Con la aparición de diluyentes de larga duración para semen porcino refrigerado que preserva el semen por más de 10 días, el uso de semen congelado como rutina para la inseminación artificial ha sido poco requerido. De todas maneras, crear un banco de semen congelado que permita planear las inseminaciones en los centros de reproducción porcina, podría ser beneficioso (Yeste, 2015).

La criopreservación de semen puede causar daños bioquímicos y funcionales en el espermatozoide, con reducción de la movilidad, viabilidad y transporte en el tracto genital femenino (Leboeuf *et al.*, 2000). De esta manera, el daño del espermatozoide porcino podría representar una reducción en el potencial fertilizante. La elección adecuada del diluyente es crucial para el éxito de la criopreservación de semen en cualquier especie. La composición de los diluyentes incluye crioprotectores, azúcares, buffers y otros aditivos que interactúan con las membranas celulares e indirectamente con otras estructuras durante el proceso de congelamiento profundo. Los componentes básicos de los diluyentes son los mismos desde hace 35 años, incluyendo yema de huevo, glicerol (Pursel y Johnson, 1975), un azúcar y un detergente. La yema de huevo protegería a la célula del shock por frío. El glicerol es el crioprotector permeable más utilizado para congelar semen en muchas especies incluyendo el cerdo; sin embargo, puede provocar efectos tóxicos, químicos, osmóticos y cambios en la estructura lipídica de la membrana espermática. Diferentes concentraciones de glicerol, que varían entre 2 a 10%, han sido utilizadas para criopreservar semen de mamíferos y varios estudios han demostrado que la concentración de glicerol más adecuada para congelar semen porcino está en el rango del 2-4 % (Westendorf *et al.*, 1975; Holt, 2000). Debido a la alta toxicidad del glicerol, actualmente se están probando otros crioprotectores como las amidas. Las amidas tienen menor peso molecular y mayor solubilidad en agua, por eso disminuyen la formación

intracelular de cristales de hielo y provocan una mínima toxicidad y un menor daño osmótico (Ashwood-Smith, 1987).

La curva de congelamiento que se utiliza en la actualidad para congelar semen porcino es una curva lenta, diseñada por Westendorf (modificada) (Westendorf *et al.*, 1975), donde se produce un descenso paulatino de la temperatura durante un tiempo muy prolongado, alrededor de 5 horas, hasta su congelamiento. Miragaya *et al.* (2001) desarrollaron un protocolo de congelamiento para semen equino, aplicando una curva rápida, que consta de una estabilización corta, un descenso rápido en dos fases hasta alcanzar los -120°C y finalmente la inmersión de las pajuelas en nitrógeno líquido a -196°C . El desarrollo completo de esta curva lleva aproximadamente diez minutos.

En la práctica, la calidad seminal se evalúa mediante un espermograma clásico, que aplica pruebas rápidas, simples y económicas. La valoración de la morfología espermática ha sido tradicionalmente incluida en el análisis seminal clásico, debido a que potencialmente puede determinar las variaciones celulares que afectan la fertilidad (Gadea, 2005). El porcentaje de anomalías varía aproximadamente entre el 7 y 30 % (Rueda *et al.*, 2006), con un límite de 30% (Rozeboom, 2004). La morfología también puede usarse como indicador de la habilidad de los espermatozoides para sobrellevar los procesos de almacenaje, enfriado, congelado y descongelado, evaluando por ejemplo el aspecto del acrosoma o la presencia de colas dobladas para indicar daños a nivel de membrana o del flagelo, respectivamente, y de esa manera permite evitar el uso de cierto semen procesado para la IA (Rodríguez-Martínez, 2005).

Durante el procesamiento y conservación seminal pueden ocurrir cambios espermáticos morfofuncionales de importancia, que alteran su calidad y su potencial fertilidad; en diferente proporción de acuerdo al tipo de alteración celular, motivo por el cual, se recomienda poner especial énfasis en el estudio rutinario de la morfología espermática, en especial la del acrosoma (Pérez Marcos *et al.*, 1991). De los resultados del trabajo de Torretta *et al.* (2010), se concluyó que la refrigeración provoca leves alteraciones espermáticas, ya que hallaron diferencias significativas en las patologías espermáticas totales, en las patologías de cabeza, de acrosoma, de cuello y pieza media entre el semen porcino fresco y refrigerado.

Hasta el momento los cambios incorporados (nuevos procedimientos de congelación, diluyentes, aditivos, envases, etc.) por los investigadores han sido dirigidos a optimizar los sistemas de congelación para obtener una calidad seminal aceptable tras la descongelación. Sin embargo, todavía hay muchos aspectos que pueden mejorar sensiblemente. Por lo tanto, en este trabajo se propone evaluar el efecto sobre los espermatozoides de dos curvas de congelación y dos crioprotectores en la congelación de semen porcino.

MATERIALES Y METODOS

1. Obtención, tratamiento y congelamiento del semen

Se utilizaron seis machos de fertilidad comprobada pertenecientes a un establecimiento privado. Las muestras de semen se obtuvieron mediante la técnica de mano enguantada (King y Macpherson, 1973), recolectando sólo la fracción rica en espermatozoides. Para ello se utilizó un recipiente plástico, colocado dentro de un termo de boca ancha temperado a 37 °C y cubierto con triple capa de gasa para filtrar el semen e impedir el paso del gel. Las muestras llegaron al laboratorio a 17 °C dentro de las 24 horas de extraído. Se procesaron doce eyaculados ($n=6$; $r=2$) que tenían como mínimo un 70% de movilidad progresiva (evaluación subjetiva con microscopio óptico y platina termostatzada).

Para cada eyaculado se realizaron dos curvas de congelamiento en forma simultánea:

Curva rápida:

Las muestras diluidas en medio comercial Androstar® plus (Minitub, Alemania) se dividieron en dos alícuotas. Se centrifugó 15 minutos a 800 g, se aspiró el sobrenadante y el pellet fue rediluido a una concentración de 300 millones de espermatozoides/ml con los siguientes diluyentes:

- a) Dimetilformamida (DMF) 5%, lactosa 11%, yema 20%, Equex 0,5%
- b) Glicerol 3%, lactosa 11%, yema 20%, Equex 0,5%

El semen diluido se equilibró 30 minutos a temperatura ambiente, luego se envasó en pajuelas de 0,5 ml. Las pajuelas fueron colocadas en gobeletes plásticos y sumergidos en una mezcla de etanol-acetona 1:1 dentro de un canastillo de bronce. Se realizó una curva rápida de congelamiento según Miragaya *et al.* (2001). Brevemente, el canastillo fue mantenido dentro del termo de nitrógeno (de 10 litros) a 6 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido, controlando el descenso de la temperatura con un termómetro digital desde la temperatura ambiente hasta -15 °C (10-12 °C/minuto). Luego se llevó el canastillo hasta el nivel del

nitrógeno líquido hasta alcanzar los -120 °C (25 a 40 °C/minuto) y finalmente las pajuelas se sumergieron a -196 °C en nitrógeno líquido.

Curva lenta (Westendorf modificada)

Se diluyó el semen con el medio comercial Androstar® plus (Minitub, Alemania) y se estabilizó a 17 °C durante 2 horas, luego se centrifugó a 800 g 15 minutos y se aspiró el sobrenadante. El pellet fue rediluido a una concentración de 300 millones de espermatozoides/ml con los mismos diluyentes de la curva rápida:

- a) DMF 5%, lactosa 11%, yema 20%, Equex 0,5%
- b) Glicerol 3%, lactosa 11%, yema 20%, Equex 0,5%

El semen diluido se equilibró 2 horas a 5 °C en heladera y luego se envasó en pajuelas de 0,5 ml para luego proceder al congelamiento profundo en caja de telgopor aislada, a 5 cm de altura de nitrógeno, durante 20 minutos. Finalmente las pajuelas se sumergieron en nitrógeno líquido.

2. Descongelamiento y redilución de las pajuelas

Las pajuelas se descongelaron a 37 °C durante un minuto y fueron diluidas en 1 ml de medio Androstar® plus (Minitub, Alemania).

3. Evaluación del semen porcino pos descongelado

Evaluación de los parámetros dinámicos de las muestras de semen descongelado

Se evaluó la movilidad espermática total y progresiva de manera subjetiva por observación directa con microscopio óptico y platina termostática a 37 °C.

Asimismo, se realizó una evaluación de la movilidad espermática utilizando un sistema computarizado (CASA: Computer Assisted Semen Analysis), el ISAS v1 (Proiser®, Valencia, España) para determinar los parámetros cinemáticos de la movilidad espermática (Figura 1).

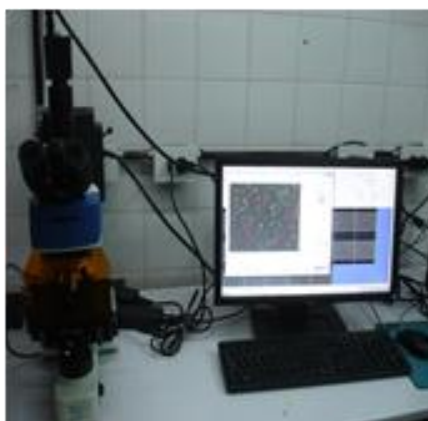
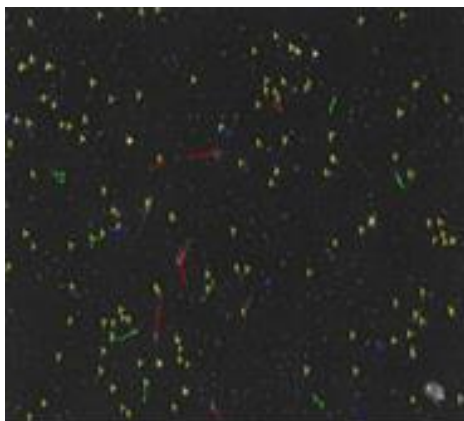


Figura 1. Imagen del sistema computarizado CASA

Para ello, las muestras de semen se colocaron en una cámara ISAS D4C (Proiser®, Valencia, España) atemperada a 37 °C. En cada muestra se analizaron al menos 200 espermatozoides móviles. En todos los casos, se evaluó el total de espermatozoides móviles y el total de espermatozoides con movilidad progresiva (expresado en %). Se analizaron los siguientes parámetros cinemáticos: velocidad curvilínea

(VCL: velocidad media de la trayectoria de la cabeza del espermatozoide; expresada en $\mu\text{m}/\text{seg}$), velocidad en línea recta (VSL: velocidad media medida en línea recta entre el primer y último punto de la trayectoria; expresada en $\mu\text{m}/\text{seg}$), velocidad de trayectoria media (VAP: distancia promedio que el espermatozoide ha atravesado durante el período de análisis; expresada en $\mu\text{m}/\text{seg}$), amplitud del

desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, amplitud de las oscilaciones de la cabeza del espermatozoide; expresada en μm), frecuencia de bateo espermático (BCF: frecuencia con que la cabeza atraviesa la trayectoria del espermatozoide; expresada en Hertz), rectitud (STR; expresada en %; $\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP} \times 100$) y linealidad (LIN; expresada en %; $\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL} \times 100$).

Evaluación de viabilidad espermática e integridad acrosomal del semen descongelado

La muestra de semen se incubó a 37 °C durante 10 minutos con la lectina PNA (peanut agglutinin) marcada con

isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA) y luego 10 minutos con loduro de propidio (PI), colorante específico de ADN que sólo penetra las células que han perdido la integridad de la membrana, tiñendo el ADN de los espermatozoides muertos de color rojo. En espermatozoides sin reacción acrosomal, los acrosomas permanecen sin teñir, mientras que en los espermatozoides con reacción acrosomal, la lectina se une selectivamente a la membrana acrosomal externa, emitiendo señal fluorescente verde. Para determinar los patrones de tinción (figura 2), las muestras se colocaron entre porta y cubreobjetos y se observaron con microscopio de epifluorescencia.

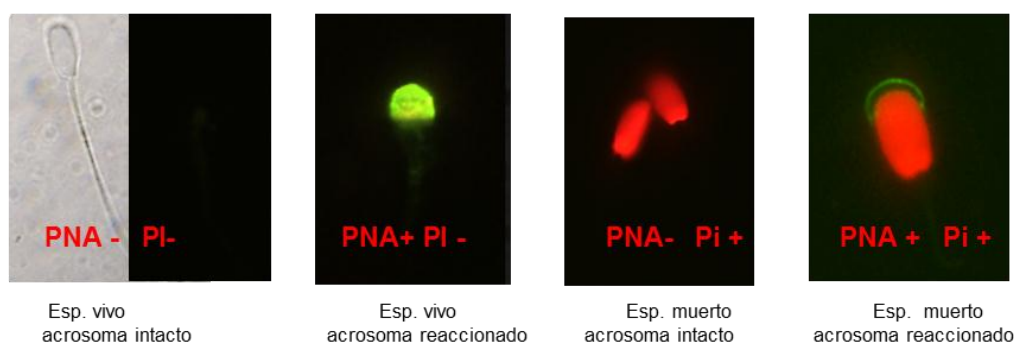


Figura 2. Patrones observados con la tinción FITC-PNA/PI en semen porcino pos descongelado.

Evaluación de la morfología espermática del semen congelado-descongelado

La morfología espermática se evaluó en las muestras de semen fresco recién extraído y en las muestras de semen congelado-descongelado. Una alícuota de semen se diluyó con solución salina formolada y se observó entre porta y cubreobjetos utilizando un microscopio de contraste de fase.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño factorial de 2 factores (curva de descenso de temperatura y crioprotector) con dos niveles

cada uno, bloqueando por macho, con un nivel de significación del 5%.

RESULTADOS

Parámetros dinámicos de las muestras de semen descongelado

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las curvas de congelamiento ni entre los crioprotectores, en ninguno de los parámetros cinéticos observados mediante el análisis computarizado. Los datos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Evaluación de los parámetros cinéticos mediante un sistema CASA. Se procesaron doce eyaculados ($n=6$; $r= 2$). Los datos son porcentajes promedio \pm DS. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los parámetros cinéticos observados en el semen porcino pos descongelado

Parámetro	Curva rápida glicerol	Curva rápida DMF	Curva lenta glicerol	Curva lenta DMF
Movilidad Progresiva (%)	12 \pm 8	10 \pm 6	10 \pm 6	10 \pm 6
Movilidad Total (%)	22 \pm 1	18 \pm 9	19 \pm 7	27 \pm 1
Velocidad Curvilínea ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	40 \pm 8	37 \pm 6	39 \pm 1	33 \pm 9
Velocidad Rectilínea ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	15 \pm 4	14 \pm 2	15 \pm 6	13 \pm 2
Velocidad Promedio ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	21 \pm 3	19 \pm 2	21 \pm 6	18 \pm 2
Índice de Linealidad (%)	38 \pm 2	38 \pm 6	39 \pm 8	42 \pm 8
Índice de Rectitud (%)	71 \pm 1	74 \pm 8	72 \pm 9	73 \pm 9
Índice de Oscilación (%)	54 \pm 6	52 \pm 6	54 \pm 6	57 \pm 1
Lateralidad cabeza (μm)	2 \pm 1	2 \pm 0	2 \pm 1	2 \pm 1
Frecuencia Batida (Hertz)	5 \pm 2	5 \pm 2	5 \pm 3	5 \pm 2

Viabilidad espermática e integridad acrosomal del semen descongelado

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las curvas y los crioprotectores en ninguno de los patrones observados con la tinción de FITC-PNA/PI (Figura 3).

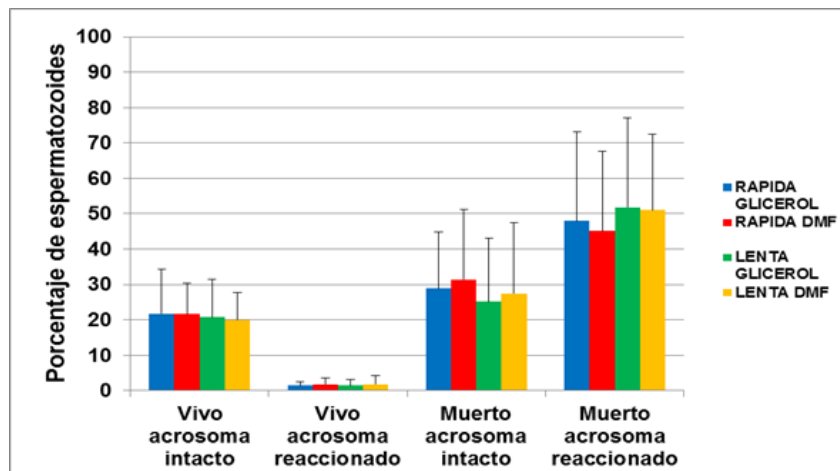


Figura 3. Evaluación de la viabilidad y estado acrosomal mediante tinción FITC-PNA/PI de semen porcino pos-descongelado. Los datos son porcentajes promedio \pm DS. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las curvas y los crioprotectores en ninguno de los patrones observados.



Figura 4. Morfo-anomalías observadas en el semen porcino pos descongelado

Morfología espermática del semen congelado-descongelado.

El porcentaje de espermatozoides normales en promedio fue de un $88\% \pm 2$. En las muestras de semen descongelado se observaron los siguientes porcentajes de anomalías espermáticas (promedio \pm DS): gota citoplasmática distal entre un $6\% \pm 1,5$; cola en ansa, $2,5\% \pm 1$; gota citoplasmática proximal, $2\% \pm 1$; cabeza suelta, $1\% \pm 0,5$; pieza intermedia, $1\% \pm 0,5$.

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las curvas y los crioprotectores en ninguno de los patrones de morfo-anomalías (figura 4) en el semen porcino pos descongelado.

DISCUSION

En este trabajo se propuso realizar una curva rápida de congelamiento que lleva solo unos minutos en reemplazo del prolongado tiempo que lleva la realización de la curva lenta que se utiliza actualmente. La curva lenta puede realizarse en un freezer programable, que tienen un alto costo económico o en una forma un poco más económica como la que se llevó a cabo en este trabajo, pero debe contarse con una heladera a $17\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una heladera a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, y también los mismos elementos que se utilizan para la curva rápida como por ejemplo gobelets, un termo de nitrógeno para almacenar las pajuelas, etc. Hasta el momento no hemos encontrado diferencias entre ambas curvas, con la ventaja que la curva rápida necesita poco equipamiento y que el mismo es de un costo razonable. Teniendo además en cuenta una de las ventajas más importantes es que la curva rápida puede realizarse a campo en cualquier granja porcina, sin la necesidad de trasladar las muestras de semen o a los

padrillos, ni tampoco se debe contar con un laboratorio altamente equipado y/o especializado.

En el año 1975, en Estados Unidos, Pursel y Johnson, y en Alemania Westerndorf, desarrollan dos métodos de congelación que pueden ser aplicados a nivel comercial y que en esencia son los que se continúan utilizando hoy en día. El método alemán (Westerndorf *et al.*, 1975) es el que ha perdurado con ciertas modificaciones, como el uso de pajuelas de menor volumen (0,5 ml) o ajustes en las condiciones de adición del glicerol, y es el más frecuentemente empleado en la actualidad (Gadea, 2004). Esta curva de congelamiento, utilizada en la actualidad para criopreservar semen porcino, es una curva lenta donde se produce un descenso paulatino de la temperatura durante un tiempo muy prolongado, alrededor de 5 horas, hasta su congelamiento. Es de notar que en el presente trabajo se obtuvieron los mismos resultados utilizando una curva rápida, que lleva sólo 10 minutos realizarla.

En nuestro trabajo no se observaron diferencias significativas entre los crioprotectores probados, el glicerol al 3% y la dimetilformamida al 5%, en ninguno de los parámetros cinéticos evaluados, ni en la morfología, ni la viabilidad e integridad del acrosoma. Existen resultados controversiales de otros estudios respecto a los distintos crioprotectores utilizados para la preservación de semen en esta especie. Según Malo *et al.* (2012), los mejores resultados pos-descongelado respecto a los parámetros de movilidad, viabilidad, integridad y funcionalidad de membrana de espermatozoides porcinos, se obtuvieron utilizando un diluyente a base de lactosa-yema y glicerol 3% cuando se los comparó con un diluyente con 3% de dimetilformamida. Estos datos coinciden con el trabajo de Kim *et al.* (2011), quienes observaron que utilizando dimetilacetamida y dimetilsulfóxido al 3, 5 y 7%, la movilidad y la integridad de membrana fueron menores que cuando se criopreservó con glicerol al 3%. Sin embargo Bianchi *et al.*, 2008, demostraron que el reemplazo del glicerol al 3 % por las amidas, dimetilformamida y dimetilacetamida al 5%, en el diluyente resulta en un aumento de la movilidad e integridad de membrana del semen porcino pos-descongelado.

En el caso del semen crioconservado, la evaluación del semen pos descongelado es de vital importancia ya que permite evaluar a través del tiempo su calidad en cuanto a la movilidad y los posibles cambios en la morfología individual espermática, permitiendo de esta forma realizar procesos de inseminación artificial con espermatozoides porcinos de aceptable calidad espermática (Medina-Robles *et al.*, 2008). En cuanto a la morfología espermática evaluada en este trabajo, no fue alterada en ningún tratamiento pos descongelado tanto con los distintos crioprotectores como tampoco con las dos curvas probadas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación en cuanto a movilidad progresiva, integridad de acrosoma y viabilidad espermática del semen porcino pos-descongelado no difieren entre las curvas propuestas, por esa razón el uso de la curva rápida sería una elección más práctica, rápida y accesible para realizar a campo.

Por otro lado en cuanto a los crioprotectores probados nuestros resultados indican que podríamos reemplazar al glicerol por la dimetilformamida.

Sería interesante seguir investigando distintos crioprotectores y distintas curvas de descenso de temperatura porque podría mejorar en el futuro los resultados en cuanto a la calidad espermática pos-descongelamiento. De este modo se podría igualar los resultados de fertilidad y tamaño de camada obtenidos utilizando inseminación artificial con semen congelado a los resultados logrados inseminando con semen fresco o refrigerado, permitiendo ampliar su uso en la producción porcina.

REFERENCIAS

- Ashwood-Smith MJ. Mechanisms of cryoprotectant action. *Symp Soc Exp Biol*, 1987. 41:395–406.
- Bianchi I, Calderam K, Maschio EF, Madeira EM, Ulguim da Rosa R, Corcini CD, Bongalhardo DC, Correa EK, Lucia JT, Deschamps JC, Correa MN. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology*, 2008. 69 632–638.
- Gadea JM. El uso de semen porcino congelado. *Mundo ganadero*, 2004.169:60-62.
- Gadea JM. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, 2005. 63: 431 - 444.
- Holt, WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod.Sci.* 2000. 62, 3–22.
- King G, Macpherson W. A comparison of two methods for boar semen collection. *Journal of Animal Science*, 1973. 36 (3): 563-565.
- Kim S, Lee YJ, Ji DB, Kim YJ. Evaluation of different cryoprotectants (CPAs) in boar semen cryopreservation. *J. Vet. Med. Science*, 2011. 73(7): 961–963.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 2000. 62: 113–141.
- Malo C, Gil L, Cano R, Martínez F, García A, Jerez RA. Dimethylformamide is not better than glycerol for cryopreservation of boar semen. *Andrologia*, 2012. 44: 605–610.
- Medina-Robles V M, Perez-Duarte BA, Cruz-Casallas PE. Efecto de la incubación postdescongelación sobre la calidad de espermatozoides crioconservados de cerdo. *Orinoquia*, 2008.12(2):149-161
- Miragaya MH, Chaves MG, Neild DM, Berretta C, Agüero A. Artificial insemination using stallion semen cryopreserved with a simple manual method. 3rd International Symposium on Stallion Reproduction. Colorado State University, Fort Collins, CO, USA. 2001.
- Pérez Marcos C, Sánchez R, Palacio M, Pursel V G, Pérez García T, Martín Rillo S. Effects of dilution rate on the motility and acrosome morphology of boar spermatozoa stored at 15° C. *Reproduction in Domestic Animals*. 1991. 26: 112 – 116.
- Polge C, Salamon S, Wilmut I. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.* 1970, 87: 424-428.
- Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*1975, 40: 99–102.
- Rodríguez-Martínez, H. Evaluación de la calidad seminal en el verraco. *Avances en tecnología porcina*, 2005. (2), 43-53.
- Rozeboom KJ. Evaluating boar semen quality. *Animal Science Facts. Extension Swine Husbandry. Publication number ANS 00-812s.* North Carolina State University. 2004. <http://mark.asci.ncsu.edu/publications/factsheets/812s> .

- Rueda M, Arias T, Caballero N, Tosar M, Acosta MJ. Análisis de la calidad espermática de sementales porcinos en dos tipos de porcicultura cubana. Revista Computadorizada de Producción Porcina, 2006. 13(1):49-58.
- Torretta ME, Rabaglino MB, Ferrero S. Caracterización cuali-cuantitativa de patologías espermáticas estudio comparativo de la incidencia de anomalías espermáticas en semen porcino fresco y refrigerado. Rev. electrón. vet. 2010, 11, N° 12 <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121210.html>
- Westendorf P, Richter L, Treu H. Zur tiefgefrierung von ebersperma: labor und besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger pailletten verfahren. Dtsch.Tieraztl. Wschr., 1975, 82: 261-267.
- Yeste M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. Reprod. Domest. Anim. 2015, 50 (2):71–79.