

FASES PREVIA Y POSTCONGELACIÓN DEL SEMEN DE VERRACO EN PAJILLAS DE 5 ML Y CAPACIDAD DE FECUNDACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

Previous phases and after freezing of boar semen in 5 ml straws and fertilizing capacity of the spermatozoa

A Córdova-Izquierdo ✉, JF Pérez-Gutiérrez, S Martín-Rillo ^{*}

(ACI) Departamento de Producción Agrícola y Animal.
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.
Calz. del hueso 1100. Col. Villa Quietud C.P. 04960, México, D.F.
aci57@prodigy.net.mx

(JFPG, SMR)
Universidad Complutense de Madrid, España.

Artículo recibido: 17 de mayo de 2004

Artículo aceptado: 14 de diciembre de 2004

RESUMEN. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de las fases previa y posterior a la congelación del semen de verraco en pajillas de 5 ml sobre la capacidad de fecundación *in vitro* (FIV) de los espermatozoides. Se utilizaron 21 eyaculados de siete animales diferentes, se compararon semen fresco, tratado (semen con todos los componentes necesarios para llevar a cabo la congelación, antes de ser sometido a la fase de vapores de nitrógeno líquido) y semen congelado en pajillas de 5 ml. Los resultados obtenidos fueron 93.81, 87.23 y 78.47 % de penetración espermática; 81.57, 76.44 y 69.11 % de monospermia; 12.24, 10.79 y 9.36 % de polispermia; 84.76, 84.28 y 47.14 % de motilidad; 79.76, 73.33 y 44.81 % de acrosomas normales (NAR) para semen fresco, tratado y descongelado, respectivamente. Al realizar el análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre semen fresco, tratado y descongelado. Por lo tanto, la disminución en la respuesta de los espermatozoides a la FIV ya se observa desde la fase previa a la congelación. Sin embargo, los resultados obtenidos con la FIV monospermica, son prometedores para el uso del semen de verraco descongelado en la inseminación artificial.

Palabras Clave: Verraco, semen, congelación-descongelación, espermatozoide, capacidad fecundante

ABSTRACT. The objective of this study was to determine the effect of the previous and later phases to the freezing of the boar semen in straws of 5 ml about the fecundation capacity *in vitro* (IVF) of the sperms. 21 ejaculated of seven different animals were used to, compared fresh semen, treaty (semen with all the necessary components to carry out the freezing, before being subjected to the phase of vapors of liquid nitrogen) and semen frozen in straws of 5 ml. The results were 93.81, 87.23 and 78.47 % of spermatic penetration; 81.57, 76.44 and 69.11 % monospermy; 12.24, 10.79 and 9.36 % polyspermy; 84.76, 84.28 and 47.14 % of motility; 79.76, 73.33 and 44.81 % of normal acrosomes (NAR) for fresh semen, treaty and thawed, respectively. When carrying out the variance analysis and the multiple comparisons test, they were differences statistically significant ($p < 0.05$) among fresh semen, treaty and thawed. Therefore, the decrease in the answer of the sperms to the IVF is already observed from the previous phase to the freezing. However, the results obtained with the IVF monospermyc, are promising for the use of the hog thawed semen in the artificial insemination.

Key Words: Boar, semen, freezing-thawing, spermatozoa, fertilizing capacity

INTRODUCCIÓN

La primera vez que se realizó con éxito la congelación de material seminal fue en 1949 cuando Polge *et al.* (1949) demostraron el poder crioprotector del glicerol. Estos investigadores lograron recuperar espermatozoides de varias especies después de congelarlos en solución con este agente crioprotector. A partir de entonces, diversas técnicas se han desarrollado para congelar material biológico, como espermatozoides, células sanguíneas, tejidos, ovocitos y embriones (Bwanga 1990; Abeydeera & Day 1997a; b; Johnson *et al.* 2000; Zhou & Yang 2000). En los centros de reproducción animal, la aplicación de estos métodos permiten la optimización y aprovechamiento de los mejores reproductores, mediante el almacenamiento de su material germinal para su uso posterior; incluso cuando el animal ha sido desechado. Además, la conservación seminal de animales con características genéticas superiores se facilita cuando están imposibilitados para realizar una reproducción por sí mismos.

A pesar de los avances en este campo, las diferencias fisiológicas de las células espermáticas entre las especies e incluso entre individuos, todavía representa un problema que aún no está resuelto (Weitze & Petzoldt 1992; Córdova Izquierdo 2002).

El uso del semen de verraco congelado, ha sido utilizado principalmente para la introducción y/o mejoramiento genético de los núcleos de selección (Holt 1996; 1997; Watson 2000). Ello se debe principalmente a que los resultados de fertilidad son más bajos cuando se le compara con semen fresco.

Cuando la congelación se realiza en vapor de nitrógeno líquido estático, como normalmente se usa, la velocidad de enfriamiento varía con el tamaño de la muestra así como con la distancia entre la superficie del nitrógeno líquido y el recipiente utilizado (Torreta *et al.* 1996). La característica importante es mantener una velocidad de enfriamiento uniforme en la mayoría de las muestras a congelar de manera simultánea.

Con el uso de congeladores programables, se pueden alcanzar velocidades de congelación uniformes en la mayoría de las pajuelas, aun cuando se congelen de 200-300 pajuelas simultáneamente. Estos congeladores representan una alternativa para la congelación del semen de verraco, ya que se pueden congelar lotes grandes de semen bajo condiciones estandarizadas y controladas. Además, sería posible el estudio del efecto de la velocidad de enfriamiento y congelación sobre la calidad espermática a diferentes intervalos de temperatura (Bwanga 1990), lo cual podría representar el futuro de la optimización y estandarización de los procedimientos para la congelación del semen en esta especie. Sin embargo, su aplicación práctica,

aún no es posible, debido al costo que representa la adquisición de dichos aparatos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de las fases previa y posterior a la congelación del semen de verraco en pajillas de 5 ml sobre la capacidad de fecundación *in vitro* de los espermatozoides.

MATERIAL Y MÉTODOS

La fracción rica en espermatozoides del eyaculado se utilizó y el semen fue obtenido mediante la técnica manual descrita por King & Macpherson (1973) de verracos de la raza Duroc de 2 a 2.5 años de edad y con fertilidad probada. Los ovocitos fueron obtenidos de ovarios de cerdas con peso promedio de 90-100 kg, las cuales fueron sacrificadas en matadero comercial. Los ovarios completamente sanos, limpios y que no presentaron estructuras, tales como cuerpos lúteos, cuerpos hemorrágicos o quistes fueron seleccionados. El experimento se realizó por triplicado, utilizando eyaculados diferentes de cada uno de los animales. Las muestras de semen fresco se tomaron inmediatamente después de la recolecta, las de semen tratado (semen con todos los componentes de la congelación) antes de someterlo a vapores de nitrógeno líquido y las de semen descongelado, inmediatamente después de la descongelación. Las disoluciones, diluyentes y medios empleados en este trabajo fueron de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA; excepto cuando se indica lo contrario. Se procedió de la manera siguiente:

Valoración del semen

El semen fue evaluado inmediatamente después de la recolecta. El volumen se midió en una probeta graduada en ml. La motilidad y calidad del movimiento se valoraron mediante una gota de la muestra sobre un portaobjetos, previamente calentado en una platina térmica a 42 °C, al final se colocaron cubreobjetos y se observaron al microscopio a 20 y 40 X. Los resultados de motilidad se expresaron como porcentaje de células espermáticas móviles (0-100). La calidad del movimiento de los espermatozoides se valoró según la técnica mencionada por Martín-Rillo *et al.* (1996) basada en la siguiente clasificación de una escala de 0 a 5 (0= espermatozoides inmóviles o muertos, 1= espermatozoides con movimientos no progresivos, girando alrededor de sí mismos, 2= espermatozoides con movimientos anormal u ocasionalmente progresivos, 3= Espermatozoides con movimientos progresivos lentos y ondulantes, 4= espermatozoides con movimientos progresivos rápidos, y 5= espermatozoides con movimientos progresivos muy rápidos).

La concentración de espermatozoides/ml se valoró con una cámara de Bürker, según el método menciona-

do por Martín-Rillo (1989), para ello se recolectó una muestra de semen de 1 ml que se diluyó a 100 ml con disolución formulada al 3 %. La cámara de Bürker se preparó con esta disolución y se contaron 40 cuadros de la misma. La concentración se obtuvo aplicando la siguiente fórmula (Martín-Rillo 1989):

Concentración de espermatozoides/ml = No. de espermatozoides en 40 cuadros pequeños contados en la cámara de Bürker X 10000

El porcentaje de acrosomas normales (NAR) se valoró con técnica de Pursel *et al.* (1972), en la cual se usaron de una a dos gotas de semen, diluidas en 1 ml de disolución de citrato de formol y observadas al microscopio con objetivo de inmersión (100 X) para valorar 100 espermatozoides por muestra. Para la congelación solamente se seleccionaron aquellas muestras procedentes de eyaculados, cuya motilidad en fresco fue mayor al 80 %, de tres a cuatro de calidad en el movimiento y de 70 a 80 % de NAR.

Congelación del semen

La congelación del semen se llevó a cabo en base al método descrito por Westendorf *et al.* (1975) con algunas modificaciones (Martín-Rillo datos no publicados) y se realizó en 11 fases en pajillas de 5 ml. Estas 11 fases fueron: (1) recolecta de la fracción rica en espermatozoides del eyaculado, (2) dilución a razón de 1:4 con diluyente MR-A/E a 32 °C, dentro de los primeros 15 min después de la colecta, (3) equilibrio del semen con diluyente, durante una hora a temperatura ambiente (Martín-Rillo 1989), (4) preparación de dosis a razón de 6×10^6 espermatozoides (dosis doble) en tubos de centrifuga de 50 ml, (5) las dosis seminales se equilibraron durante 3 h a 15 °C, (6) centrifugado a 800g durante 10 min. Decantación y eliminación del sobrenadante, (7) resuspensión del paquete

celular en el primer diluyente de congelación a 15 °C, adicionando un total de 5 ml/tubo (dosis doble), (8) enfriamiento a 5 °C en cámara o cuarto frío durante 1.5 h, (9) dilución de cada muestra a razón de 1:1 en segundo diluyente, hasta obtener 10 ml/tubo, (10) envasado del semen en pajillas (macrotubos) de 5 ml con perilla de absorción y leve agitación para ubicar la burbuja de aire en el centro, y (11) congelación de pajillas en nitrógeno líquido. Inicialmente se mantuvieron durante 20 min en la fase gaseosa (vapores), a 3 cm de la fase líquida, en un contenedor de boca ancha. Posteriormente se sumergieron en la fase líquida, donde se almacenaron hasta su descongelación para su uso.

Descongelación del semen

La descongelación del semen se realizó en baño María a 42 °C durante 40 s y se valoró motilidad, calidad del movimiento y NAR.

Capacitación *in vitro* de los espermatozoides

El medio empleado para la capacitación *in vitro* de los espermatozoides fue el TALP-HEPES (Tabla 1). El procedimiento aplicado se basó en la: (1) centrifugación del semen y resuspensión a 500 g durante 10 min y resuspensión en medio de capacitación, (2) incubación a 38 °C durante 10 min y se tomaron alícuotas (swin up), (3) incubación a 38 °C durante 2.5 h para semen fresco y tratado, y 1.5 h para semen descongelado, y (4) valoración de motilidad y la fecundación *in vitro* (FIV) se realizó con 5×10^4 espermatozoides/pocillo con 20-30 ovocitos.

Transporte de ovarios y obtención de ovocitos

Los ovarios utilizados para extraer los ovocitos fueron obtenidos del matadero y transportados en un termo

Tabla 1. Composición del medio TALP-HEPES para la capacitación *in vitro* de los espermatozoides (se recomienda que los dos últimos compuestos se agreguen a final de su disolución en agua bidestilada).

Table 1. Composition of TALP-HEPES medium for *in vitro* capacitation of the spermatozoa (it is recommended that the last two compounds are added to finish of their dissolution in bidistilled water).

Componente		PM	Cantidad para 1 litro
Nombre	Fórmula química		
Cloruro de potasio	KCl	74.55	230 mg
Cloruro de sodio	NaCl	58.44	5.84 g
Fosfato de Na monohidratado	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	137.99	40 mg
Hepes	—	238.30	2.38 g
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	84.01	2.10 g
Lactato de sodio	—	—	2.53 ml
Rojo fenol	—	—	10 mg
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ 2H ₂ O	147.02	310 mg
Cloruro de Mg hexahidratado	MgCl ₂ 6H ₂ O	203.30	300 mg

con suero fisiológico estéril a temperatura de 30-35 °C (Abeydeera & Day, 1997a; b) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Córdova *et al.* 1997) en un tiempo de 1 a 1.5 h. Los ovarios fueron lavados dos veces con suero fisiológico.

La recuperación de ovocitos se realizó por aspiración de líquido folicular de folículos de 3 a 6 mm de diámetro con jeringa estéril de 5 ml con aguja de 18 GX (Ka *et al.* 1997). El líquido folicular se depositó en tubos de centrifuga de punta cónica y se dejaron reposar durante 10 a 15 min. El sobrenadante se retiró con pipeta Pasteur y el precipitado, paquetes de ovocitos, se resuspendió en medio TCM-199 (Abeydeera & Day, 1997a; b). La suspensión de ovocitos se colocó en caja de petri y se observaron en microscopio estereoscópico para seleccionar aquellos que presentaron integridad de las células del cúmulo. Los ovocitos se depositaron en placas estériles de cuatro pocillos para lavarlos de dos a tres veces en gotas de 250 µl de medio TCM-199 a 38 °C.

Maduración *in vitro* de ovocitos

Los ovocitos seleccionados se colocaron en placas estériles de cuatro pocillos con 100 µl de medio TCM-199 enriquecido con 10% de suero fetal bovino, 0.05 mM/ml de glucosa, 0.25 mM/10ml de piruvato de Na, 10 U.I. de FSH y LH, 50 µg/ml de sulfato de gentamicina y 1 µg/ml de β-estradiol; ajustado a pH de 7.4, cubiertas con aceite mineral a 38 °C, en condiciones de humedad y 5 % de CO₂ durante 44-48 h.

Coincubación (Fecundación *in vitro*)

Después de la maduración *in vitro*, los ovocitos fueron recuperados y tratados con 100 µl de hialuronidasa (300

µg/ml) por pocillo para retirar completamente las células del cúmulo, se lavaron de dos a tres veces en gotas de 250 µl de medio TALP-fecundación (Tabla 2). Los ovocitos libres de células del cúmulo se depositaron en placas estériles de cuatro pocillos con gotas de 100 µl de medio TALP-fecundación enriquecido con 0.25 mM/10ml de piruvato de Na, 6 mg/ml de albúmina sérica bovina fracción V y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina; cubiertos con aceite mineral a 38°C en condiciones de humedad y 5 % de CO₂ durante 12-16 horas (Abeydeera & Day, 1997a; b).

Fijación y tinción de ovocitos

Al terminar el periodo de coincubación, los ovocitos fueron lavados de dos a tres veces en gotas de 250 µl de suero fisiológico a 38 °C, con el fin de retirar a los espermatozoides del medio. De 4 a 8 ovocitos se depositaron, de 1 a 2 ovocitos por gota pequeña en un portaobjeto con dos líneas de vaselina pura en sus dos lados laterales, se les colocó un cubreobjeto, se presionó éste hasta formar una burbuja alrededor del o los ovocitos y fueron sumergidos en disolución de metanol y ácido acético a la proporción de 3:1, dos partes de metanol y una parte de ácido acético, durante 24 h (Abeydeera & Day, 1997a; b).

Valoración de la fecundación *in vitro*

Los ovocitos fueron teñidos con orceína acética al 2 %, se colocó una gota de esta tinción entre el portaobjeto y el cubreobjeto para teñirlos por capilaridad durante 5 a 10 min. El porcentaje de monospermia y polispermia de los ovocitos fue valorado mediante el número de pronúcleos. También, en el microscopio a 100 X se estimó el porcentaje total de penetración espermática.

Tabla 2. Composición del medio TALP-fertilización para la fecundación *in vitro* (se recomienda que los dos últimos compuestos se agreguen al final de su disolución con agua bidestilada).

Table 2. Composition of TALP medium for *in vitro* fecundation (it is recommended that the last two compounds are added to finish of their dissolution in bidistilled water)

Nombre	Componente	Fórmula química	PM	Cantidad para 500ml
Cloruro de potasio		KCl	74.55	128 mg
Cloruro de sodio		NaCl	58.44	3.33 g
Fosfato de sodio dihidratado		NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	137.99	28 mg
Bicarbonato de sodio		NaHCO ₃	84.01	1.022 g
Lactato de sodio		—	—	0.64 ml
Rojo fenol		—	—	5 mg
Cloruro de calcio dihidratado		CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.02	150 mg
Cloruro de Mg hexahidratado		MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.30	50 mg

Tabla 3. Análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples para medias repetidas (^a significa que no existe diferencia estadísticamente significativa dentro de la misma fila; ^bindica que sí hubo diferencia estadísticamente significativa, entre las variables y tratamientos).

Table 3. Variance analysis and multiple comparisons test for means repeated (^a it means that it doesn't exist differs statistically significant inside the same line; ^bmeans there was difference statistically significant, between the variables and treatments)

Variable %	N	semen fresco	semen tratado	semen descongelado
Motilidad	21	84.76 \pm 1.12 ^a	84.28 \pm 1.11 ^a	47.14 \pm 1.97
NAR	21	79.76 \pm 1.12 ^b	73.33 \pm 0.87 ^b	44.81 \pm 2.29 ^b
Monospermia	21	81.57 \pm 0.69 ^b	76.44 \pm 0.62 ^b	69.11 \pm 0.58 ^b
Polispermia	21	12.24 \pm 0.38 ^b	10.79 \pm 0.39 ^b	9.36 \pm 0.25 ^b
Penetración	21	93.81 \pm 0.59 ^b	87.23 \pm 0.70 ^b	78.47 \pm 0.58 ^b

Análisis estadístico

Los datos fueron tratados mediante análisis de varianza para medidas repetidas y prueba de comparaciones múltiples de medias repetidas (SAS/STAT 1997). Para conservar el nivel de significación general en las pruebas de comparaciones múltiples, se penalizó el nivel de significación de cada prueba individual, dividiéndolo por el número de comparaciones realizadas. Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron para una probabilidad de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Las características espermáticas fueron afectadas por la influencia del choque frío en las fases previa y posterior a la congelación del semen de verraco. En la fase previa a la congelación, la monospermia, polispermia y penetración espermática la del semen tratado fueron significativamente menores que con semen fresco (Tabla 3). En contraste en la motilidad y NAR no se estimaron diferencias significativas entre el semen tratado y el fresco (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Los efectos de la congelación sobre las características fisiológicas de los espermatozoides de verraco han sido descritos en detalle (Watson y Plumer 1985; Holt 1997; Curry 2000; Peláez *et al.* 2002), tales como motilidad, daño acrosomal y capacidad fecundante.

En la mayoría de los casos, la motilidad de los espermatozoides de verraco después de la congelación y descongelación es menor al 50 %, alrededor del 45 % de NAR y del 35 al 40 % de capacidad fecundante (Watson 1996). No obstante, para semen de verraco se ha registrado una motilidad espermática del 40 al 50 % para el congelado en pellets y del 20 al 40 % para el congelado en pajillas (Pursel & Johnson 1975).

En este trabajo las características espermáticas fueron afectadas por la influencia del choque frío en las

fases previa y posterior a la congelación del semen de verraco. La excepción fue la motilidad, la cual no mostró diferencia significativa entre el semen tratado y el fresco. No obstante, el porcentaje de penetración espermática encontrado con semen fresco resultó similar al registrado por Martínez *et al.* (1996), quienes trabajaron con semen de verraco diluido almacenado a 16 °C durante 24 h con una concentración por ml de espermatozoides más alta que la utilizada en este trabajo.

El porcentaje de monospermia y motilidad fueron similares a los encontrados por Córdova *et al.* (1997; 2001; 2002) al emplear las mismas condiciones de FIV y concentración de espermatozoides eyaculados frescos. Un hecho importante de destacar es el bajo porcentaje de polispermia obtenido al utilizar semen fresco y tratado, lo cual contrasta con los resultados de Coy *et al.* (1993), quienes mencionaron que esta característica espermática de penetración está por arriba del 40 % en la especie porcina, lo cual representa un problema para la FIV en esta especie, es probable que se deba a la concentración de espermatozoides empleada en este trabajo.

Al comparar el porcentaje de monospermia obtenido con semen descongelado procedente de pajillas de 5 ml con los de semen tratado y fresco se observó el efecto de las fases previa y posterior a la descongelación sobre la respuesta de los espermatozoides a la FIV, lo cual coincide con lo indicado por Watson (1996), quien mencionó que en la mayoría de los casos, el proceso de congelación afecta la capacidad de FIV de los espermatozoides de verraco entre el 35 y 40 %. No obstante, los resultados con cerdos han indicado que la FIV obtenida después de congelación del semen varía ampliamente (Nagai *et al.* 1988; Bwanga 1990; Córdova-Izquierdo 2002), lo cual ha llevado a los investigadores a trabajar en gran cantidad de variables, incluyendo el uso de diversos diluyentes, crioprotectores, diferentes geometrías de congelación y métodos de descongelación.

Con semen congelado de porcino, los porcentajes de ovocitos fecundados por espermatozoides epididimarios

fueron de 0 a 40 %, mientras que con espermatozoides eyaculados no hubo fecundación (Nagai *et al.* 1988).

Bajo diferentes condiciones de estro en la cerda, sobre todo cuando el número de espermatozoides se aumentó artificialmente, la polispermia fue de 30 a 40 % (Córdova *et al.* 1997; 2001; 2002). En cambio, en las condiciones de trabajo *in vitro* en este estudio con una concentración de espermatozoides de 6×10^6 /ml, el porcentaje de polispermia fue de 9.4 a 10.7 con semen fresco, tratado y congelado en pajillas de 5 ml. Los resultados de ambas investigaciones contrastan con los registrados por (Betancourt *et al.* 1993), quienes no encontraron algún caso de polispermia al realizar FIV en porcino empleando semen fresco. Sin embargo, el porcentaje de polispermia con

FIV descongelado y fresco fue muy variable, entre 0 a 28 % y 0 a 30 %, respectivamente (Córdova *et al.* 1997).

La evaluación del efecto de la fase previa a la congelación del semen de verraco sobre la capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides ha sido limitadamente registrada en la literatura disponible. Sin embargo, la influencia del choque frío en la fase previa a la congelación sobre la disminución de la respuesta de los espermatozoides a la FIV es clara. Por lo tanto, la disminución en la respuesta de los espermatozoides a la FIV se observa desde la fase previa a la congelación del semen. Los resultados obtenidos de FIV monospermica son alentadores para el uso del semen de verraco congelado-descongelado en la inseminación artificial porcina.

LITERATURA CITADA

- Abeydeera LR, Day BN (1997a) Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57: 729-734.
- Abeydeera LR, Day BN (1997b) *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* 48: 537-544.
- Betancourt M, Fierro R, Ambriz D (1993) *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 40: 1155-1160.
- Bwanga CO (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.
- Córdova A, Ducolomb Y, Jiménez Y, Casas E, Bonilla E, Betancourt M (1997) *In vitro* fertilizing capacity of frozen-thawed boar semen. *Theriogenology* 47: 1309-1317.
- Córdova A, Pérez JF, García-Artiga C, Martín-Rillo S (2001) *In vitro* fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Reprod. Dom. Anim.* 36: 199-202.
- Córdova A, Pérez-Gutiérrez JF, Lleo-Casanova B, García-Artiga C, Álvarez A, Volodymyr D, Martín-Rillo S (2002) *In Vitro* fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Theriogenology* 57: 2119-2128.
- Córdova-Izquierdo A (2002) Biotecnología de la reproducción en la especie porcina: papel de la criopreservación espermática. *Porci Aula Veterinaria Monografía de actualidad* 72: 11-20.
- Coy P, Martínez E, Ruiz S, Vázquez JM, Roca J, Matás C (1993) Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation *in vitro* in pigs. *Theriogenology* 40: 539.
- Curry MR (2000) Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews Reprod.* 5: 46-52.
- Holt WV (1996) Can we predict fertility rates? making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.* 31: 17-24.
- Holt WV (1997) Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.* 9: 309-319.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC (2000) Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 143-172.

- Ka HH, Sawai K, Wang WH, Niwa K (1997) Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *in vitro*. Biol. Reprod. 57: 1478-1483.
- King GJ, Macpherson JW (1973) A comparison of two methods for boar semen collection. J. Anim. Sci. 36: 563-565.
- Martín-Rillo S (1989) Aportación al estudio de la congelación del semen de verraco. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Martín-Rillo S, Martínez E, García-Artiga C, de Alba C (1996) Boar semen evaluation in practice. Reprod. Dom. Anim. 35: 519-526.
- Martínez E, Vázquez JM, Matas C, Roca J (1996) Are Washing and preincubation of boar spermatozoa really necessary to penetrate pig oocytes under *in vitro* conditions?. Reprod. Dom. Anim. 31: 317-320.
- Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A (1988) *In vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. J. Reprod. Fert. 84: 585.
- Peláez J, Domínguez JC, Peña FJ, Robles P, Ferraras A, Alegre B (2002) Conceptos básicos en criobiología del espermatozoide. Porci Aula Veterinaria Monografía de actualidad 72: 23-36.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164: 666.
- Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB (1972) Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. J. Anim. Sci. 34: 278-283.
- Pursel VG, Johnson LA (1975) Freezing of boar spermatozoa fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. J. Anim. Sci. 40: 99-102.
- SAS/STAT (1997) User's guide version 6. SAS Institute Inc. SAS Campus Drive. Cary, North Carolina 27513. USA.
- Torreta ME, Wevar CA, Forchetti OD, Moschetti E (1996) Efecto de la congelación a distintas alturas sobre el nivel de nitrógeno líquido, en presencia o ausencia de un diluyente de descongelación, sobre la calidad posdescongelación de espermatozoides porcinos congelados en macropajuelas. Avances en Producción Animal 21: 179-184.
- Watson PF (1996) Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. Reprod. Dom. Anim. 31: 135-140.
- Watson PF (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim. Reprod. Sci. 60-61: 481-492.
- Watson PF, Plumer JM (1985) The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. Proc. First Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen. Uppsala, Sweden. 113-127.
- Westendorf P, Richter L, Treu H (1975) Zur tiefgefrierung von ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberg Paillet-ten-Verfahren. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 82: 261.
- Weitze KF, Petzoldt R (1992) Preservation of semen. Anim. Reprod. Sci. 28: 229-235.
- Zhou CX, Yang ZM (2000) Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during *in vitro* storage under different temperatures. Theriogenology 53: 1477-1488.

