

**REDVET** Rev. electrón. vet. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> -<http://revista.veterinaria.org>  
Vol. 11, N° 12 Diciembre/2010– <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121210.html>

## **Caracterización cuali-cuantitativa de patologías espermáticas estudio comparativo de la incidencia de anomalías espermáticas en semen porcino fresco y refrigerado**

**María Elena TORRETTA<sup>1</sup>, María Belén RABAGLINO<sup>2</sup> y Susana FERRERO<sup>3</sup>**

Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC). Facultad de Agronomía y Veterinaria. Ruta Nacional 36, Km 601. Estafeta postal N° 9 - (5800). Río Cuarto, Provincia de Córdoba. República Argentina.

Contacto. [mtorretta@ayv.unrc.edu.ar](mailto:mtorretta@ayv.unrc.edu.ar)

### **RESUMEN**

El objetivo de este trabajo fue caracterizar cualitativa y cuantitativamente a las anomalías morfológicas observadas en muestras de semen porcino fresco y refrigerado y compararlas entre sí, a fin de diferenciar su origen. El trabajo se realizó en la Universidad Nacional de Río Cuarto y en un criadero porcino de la Provincia de Bs. As, Argentina. El semen se colectó, cada 7 días durante 12 meses, por método manual, de 10 verracos híbridos, adultos. Inmediatamente post colecta, se realizaron las evaluaciones seminales de rutina. Para estudiar las patologías espermáticas, se fijó 1 ul de semen en 100 ul de una solución de formol salino tamponado (FST). Posteriormente, se colocó una gota de esta muestra húmeda entre porta y cubreobjetos y se observó en microscopio de contraste de fases a 1200 X, contando en guarda griega un total de 100 espermatozoides. Las patologías espermáticas se clasificaron y cuantificaron según su posición en la célula (Barth, 1989) y posteriormente se caracterizaron de acuerdo a su origen (Blom, 1950). Los eyaculados que cumplían con las exigencias mínimas de calidad, se diluyeron y refrigeraron a 15 – 17° C, en dosis de  $3 \times 10^9$  espermatozoides en 80 ml de diluyente comercial de larga duración. Para estudiar la morfología espermática, inmediatamente post refrigeración, se fijó 1 ul de semen diluido proveniente de cada muestra en 50 ul de FST, evaluándolo y clasificándolo igual que al semen fresco, excepto los acrosomas para los cuales se usó la clasificación de Pursel y col (1972). Para el análisis estadístico se realizaron un análisis descriptivo de los datos y un inferencial mediante un Análisis de

la Varianza y test a posteriori de Tukey. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para  $p \leq 0.05$ .

Los porcentajes totales e individuales de patologías espermáticas encontrados en el semen fresco y en el refrigerado se muestran en la siguiente tabla

**Tabla N° 1.** Porcentajes promedio y error estándar de patologías espermáticas totales (PET), patologías de cabezas (PCa), de acrosoma (PA), de cuello y pieza media (PPM), de pieza principal (PPP) y de pieza final de la cola (PPF), gota citoplasmática proximal (GCP) y gota citoplasmática distal (GCD), hallados en las muestras de **semen fresco y refrigerado** de verracos usados para inseminación artificial. n= 10

SEMEN	PET (%)	PCa (%)	PA (%)	PPM (%)	PPP (%)	PPF (%)	GCP (%)	GCD (%)
Fresco	9,14	0.48	0.00	1,41	2,23	0.63	0.99	3.39
	± 1.05a	± 0.26c	± 0.00e	± 0.65g	± 0.79	± 0.35	± 0.45	± 0.57
Refrigerado	15.30	1.75	1.03	3.42	3.53	1.29	1.16	3.12
	± 1.42b	± 0.56d	± 0.25f	± 0.46h	± 0.70	± 0.50	± 0.37	± 0.54

Letras diferentes indican diferencias significativas: a - b ( $p = 0.00022$ ); c - d ( $p = 0,008$ ); e - f ( $p = 0,003$ ); g - h ( $p = 0,02$ ). Sin letra no se detectaron diferencias significativas.

De los resultados del presente trabajo, se concluye que la refrigeración provoca leves alteraciones espermáticas, las cuales se pueden calificar, cuantificar y diferenciar de las propias del semen fresco mediante técnicas de evaluación microscópicas de escasa complejidad.

## SUMMARY

The objective of this study was to characterize qualitatively and quantitatively the morphological abnormalities observed on fresh and refrigerated porcine semen and to compare them, in order to differentiate their origin. The research was performed at the National University of Río Cuarto and at a porcine farm located in the province of Buenos Aires, Argentina. Semen was collected manually from ten hybrid adults boars adults, every 7 days during 12 months. Routine evaluations of semen were conducted immediately after collection. To study the sperm pathologies, 1 ul of semen was fixed in 100 ul of a buffered saline formol (FST) solution. Then, a drop of this wet sample was placed between the cover and slide and was observed in phase contrast microscope at 1200 X, counting a total of 100 sperm. Sperm pathologies were classified and quantified according their position in the cell (Barth 1989) and

characterized according their origin (Blom,1950). Those ejaculates meeting the minimum requirements of quality were diluted and refrigerated at 15 - 17 ° C in doses of  $3 \times 10^9$  sperm in 80 ml of long-term commercial extenders. To study sperm morphology, 1 ul of diluted semen from each sample was fixed in 50 ul of FST immediately after refrigeration. They were evaluated and classified like fresh semen, except for the acrosomes that were classified according Pursel et al. (1972). For the statistical analysis descriptive analysis and the analysis of variance test were performed. For individual pathology, a random measure repetitive design was used with pig as random factor and fresh and refrigerated semen as repeated factor. Samples were nested in pig and crossed with semen levels. In addition, a Sox dispute analysis for normal populations for paired samples (paired t-test) was conducted in order to compare each seminal pathology.. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. The total and individual sperm pathologies percentages found in fresh and refrigerated semen are shown in the following table:

**Table N° 1.** Average percentage and standard deviation of total sperm pathologies (PET), pathologies of heads (PCa), acrosome (PA), neck and middle part (PPM), main part (PPP) and final part of the tail (PPF), proximal cytoplasmic drop (GCP) and distal cytoplasmic drop (GCD) found in refrigerated and fresh semen from boars used for artificial insemination. n = 10

SEMEN	PET (%)	PCa (%)	PA (%)	PPM (%)	PPP (%)	PPF (%)	GCP (%)	GCD (%)
<b>Fresh</b>	9,14 ± 1.05a	0.48 ± 0.26c	0.00 ± 0.00e	1,41 ± 0.65g	2,23 ± 0.79	0.63 ± 0.35	0.99 ± 0.45	3.39 ± 0.57
<b>Refrigerate</b>	15.30 ± 1.42b	1.75 ± 0.56d	1.03 ± 0.25f	3.42 ± 0.46h	3.53 ± 0.70	1.29 ± 0.50	1.16 ± 0.37	3.12 ± 0.54

Without letters no significant differences. Different letters indicate significant differences: a - b = (p = 0.00022); c - d (p = 0.008); e - f (p = 0.003); g - h (p = 0.02).

From these results is concluded that refrigeration causes mild sperm alterations that could be qualified, quantified, and differentiated from the fresh semen through microscopic evaluation techniques of low complexity.

## INTRODUCCIÓN

La utilización de la inseminación artificial (I.A.) en porcinos se ha incrementado de manera ostensible en las últimas décadas. Más del 35 % de las cerdas existentes en el mundo son fertilizadas por I.A. (Decuadro-Hansen, 2004), y en el 99 % de ellas se usa semen refrigerado a 15 – 20° C (Johnson y col., 2000).

Para lograr el éxito reproductivo en programas de I.A., es indispensable evaluar la calidad seminal antes y después del procesamiento del eyaculado (Hammerstedt, 1996). Si bien, la evaluación del semen porcino está dirigida a su uso en la inseminación artificial con semen refrigerado, técnica que se utiliza de rutina para preservar el semen en los establecimientos de producción intensiva (García Ruvalcaba y col. 1997); en la actualidad la tendencia apunta al uso de la inseminación post-cervical (IPC) e incluso intrauterina (IIU), que posibilitan reducir el número de espermatozoides por dosis inseminante (García y col., 2007). En la inseminación intracervical (IIC) tradicional deben usarse alrededor de  $3 \times 10^9$  espermatozoides en 100 ml de diluyente, mientras que en IPC se necesitan  $1 - 1.5 \times 10^9$  en 50 ml espermatozoides y en la IIU  $0.6 \times 10^9$  en 20 ml. El lugar de deposición y el menor volumen de diluyente evitan *per se* la pérdida espermática por reflujo, todo lo cual contribuye a reducir la cantidad de espermatozoides necesario por dosis y a eficientizar el uso de los reproductores, ya que puede reducirse su número de 10 en IIC a 5 en IPC y a 2 en IIU (Martínez y col. 2010).

Cuando se aplican estas técnicas de IA, el análisis de la calidad de los espermatozoides que se utilicen para estos propósitos adquiere una mayor importancia, imponiéndose la selección de los eyaculados que contengan una población de espermatozoides de óptima calidad (Barrera y Buxadé Carbó (2007); García y col, 2007).

En la práctica de terreno, la calidad seminal se evalúa mediante el espermiograma clásico, que aplica pruebas rápidas, simples y económicas (Gadea, 2005), que permiten, mediante la combinación de los parámetros evaluados, estimar la calidad seminal (Woelders, 1991). 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). No obstante y a pesar de que se han logrado avances en la evaluación de la calidad del eyaculado, su valor predictivo de la fertilidad, aún no es una tarea resuelta (Sellés Soriano, 2008).

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 y col., 1991). Asimismo, el estudio de la morfología espermática ofrece información acerca de la eficiencia de la espermatogénesis y puede facilitar la selección de verracos en los programas de inseminación artificial (Waberski y col., 1990). Varios autores han descrito una correlación inversa entre el número de formas anormales y la fertilidad (Martínez y col., 1986; Galli y Bosisio, 1988; Waberski y col., 1990; Woelders, 1991; Zeuner 1992; Waberski y col., 1994a; Evenson y col., 1994; Gadea y col., 1998; 2004; Johnson y col., 2000).

En los centros de cría intensiva y de producción de dosis seminales, se evalúan las formas anormales de cabeza, acrosoma, pieza media y cola; con más énfasis en la presencia y ubicación de la gota citoplasmática, colas dobladas, colas enrolladas y cabezas desprendidas (Larsson, 1986; Althouse, 1997; Serrano y col., 1989, 1996; Rueda y col., 2006).

El acrosoma es una de las estructuras más susceptibles en el espermatozoide a sufrir daño, después de diluido el semen factores como el estrés térmico, el periodo de conservación y el efecto del diluyente, en dependencia de los reactivos que formen parte de él, pueden representar factores altamente negativos para el acrosoma (Kommisrud y col., 2002). Acosta y col. (2007), consideraron que los estudios de acrosomía ofrecen alta precisión. Se realizan en preparados húmedos o en frotis teñidos, usando microscopio de contraste de fases. Los acrosomas se pueden agrupar en cuatro tipos, NAR (normal apical ridge), DAR (damaged apical ridge), LAC (loose apical ridge) y MAR (missing apical ridge), de acuerdo a la clasificación propuesta por Pursel y col. (1972).

Los valores promedio de anormalidades espermáticas en el semen fresco de verracos normales, tienen variaciones debidas a numerosas causas que caracterizan cada tipo de producción en esta especie (Rozeboom, 2004). El porcentaje de anormalidades varía, aproximadamente entre el 7 y 30 % (Serrano y col., 1996; Crabo, 1997; Flowers, 1998; Rueda y col., 2006), con un límite de 30% (Rozeboom, 2004) y un promedio de 17 % (Martín Rillo, 1982; Gibson, 1983). Bonet y col. (1998) señalan como aceptable un 5 % de patologías de cabeza, si bien, por norma general se suele encontrar alrededor de un 10 % (.) Kubus (1999), indicó que las patologías de cuello no son frecuentes en el espermatozoide de verraco. Si bien, se ha observado que inserción abaxial tiene alta incidencia, alrededor del 18 %, en verracos de todas las razas (Hancock y Howel, 1959; Knoll y Kastyak, 1982, Serrano y col., 1989), valores que se incrementan con la refrigeración (Pérez marcos y col., 1991). Johnson y col. (1988) plantean que la fertilidad del semen porcino conservado

está muy influenciada por la calidad del semen fresco, el número de espermatozoides por dosis y la composición del diluyente utilizado. Asimismo la capacidad fertilizante del semen diluido, independientemente del diluyente usado, se reduce severamente cuando el tiempo de almacenamiento excede las 72 horas Weitze (1990). Kommisrud y col, (2002) también hallaron reducción de la integridad acrosomal, en función de la duración del periodo de conservación, en estudios utilizando el diluyente BTS. El porcentaje de acrosomas normales inmediatamente postrefrigeración debe ser alto, ya que el almacenamiento favorece el daño acrosómico (Kommisrud y col., 2002). La morfología acrosomal se deteriora en mayor o menor grado según el choque térmico a que sea sometida la célula; progresando en semen congelado desde NAR a DAR, a MAR y a LAC, según el grado y tiempo de enfriamiento. Los espermatozoides se dañan tanto por el enfriamiento entre 37 y -10° C durante la congelación como por el calentamiento (Hancock, 1952).

Las gotas citoplasmáticas proximales (GCP) son patologías espermáticas, que tienen incidencia sobre la fertilidad, por lo que en altos porcentajes pueden estar asociadas a una degeneración o hipoplasia testicular. Las gotas citoplasmáticas distales (GCD) son indicativas del grado de maduración espermática y no afectan a la fertilidad. Pueden ser provocadas por el uso excesivo de los machos, que puede ocasionar un pasaje muy rápido de los espermatozoides por el epidídimo, impidiendo la maduración espermática y la eliminación de la gota citoplasmática distal (Gibson, 1983).

Asimismo, Mazzarri y Fuentes (1978) y Fuentes y col. (1989) observaron un amplio rango entre las características espermáticas, debido a las grandes variaciones individuales por efectos de factores intrínsecos (raza y edad) y extrínsecos (clima y manejo) y determinaron que el porcentaje promedio de anormalidades espermáticas era de 13,66 %

Las patologías espermáticas también pueden ser categorizadas según su origen en primarias, cuando se producen durante la espermatogénesis; secundarias producidas después que los espermatozoides abandonan el testículo y terciarias provocadas por el método de obtención, de evaluación o de conservación del semen.

Conociendo el tipo y número de anormalidades espermáticas en semen fresco y refrigerado se podría inferir la proporción y tipo aceptable de cada una de ellas en el semen fresco a fin de mantener luego de la refrigeración una calidad seminal aceptable para inseminar.

El propósito de este trabajo fue evaluar comparativamente las patologías espermáticas en muestras de semen fresco e inmediatamente postrefrigerado.

## **OBJETIVOS**

Caracterizar cualitativa y cuantitativamente a las anomalías morfológicas observadas en muestras de semen porcino fresco y refrigerado y compararlas entre sí, a fin de diferenciar su origen.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El trabajo se realizó en los laboratorios de Reproducción Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto y en una empresa de explotación porcina de la Provincia de Buenos Aires, Argentina; en la que se seleccionaron diez reproductores porcinos híbridos, con edades entre 24 y 36 meses, que al examen físico no presentaban alteraciones sanitarias ni reproductivas y que mostraban un excelente desarrollo testicular. Los verracos continuaron alojados y manejados junto al resto de los reproductores de la granja y sometidos a un ritmo semanal de colecta de semen. El semen era obtenido mediante el método manual (Martín Rillo, 1982)

A los fines de esta investigación se realizó la siguiente rutina de trabajo:

### **1. Obtención del semen**

La fracción rica en espermatozoides del eyaculado se colectó cada 7 días, durante 12 meses. 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 de las partículas de gel, y debidamente esterilizado.

### **2. Evaluación del semen fresco**

Inmediatamente post colecta, el eyaculado se llevó al laboratorio de la granja, donde, a fin de determinar su calidad, se evaluaron los siguientes parámetros:

#### *Macroscópicos*

Para observar el volumen, aspecto y color, el semen se colocó en una probeta graduada de 500 ml, entibiada a 37° C.

El pH se controló colocó una gota de semen sobre un trozo de cinta de pH (Neutralit<sup>®</sup> Merck, pH 5,5 - 9)

### *Microscópicos*

El porcentaje de motilidad espermática progresiva se determinó colocó una gota de semen entre portaobjeto y cubreobjeto tibios y observándola a 400 X en un microscopio de contraste de fases, sobre platina termostatzada a 37° C.

Para el recuento espermático se realizó una dilución seminal de 1:200 con solución de formol salino tamponado (FST) a 37° C, se cargó en una cámara de Neubauer modificada, la cual se colocó en el microscópico para realizar el contaje.

Para estudiar las patologías espermáticas, especialmente del acrosoma, 1 ul de semen se fijó en 100 ul de una solución de formol salino tamponado. Posteriormente, una gota de esta muestra húmeda se colocó entre porta y cubreobjetos y se observó en microscopio de contraste de fases a 1200 X (Carl Zeiss Standard WL) con objetivo 100 X, ocular de 12 X), contando en guarda griega sobre un total de 100 espermatozoides.

Las anormalidades fueron clasificadas en cinco tipos de acuerdo a su localización en la célula (Barth, 1989): patologías de cabeza (PCa); de acrosoma (PA); de cola divididas en pieza intermedia y cuello (PPM), pieza principal (PPP), pieza final (PPT). Gota citoplasmática proximal (GCP) y distal (GCD). A la sumatorias de todas ellas se la denominó patologías espermáticas totales (PET). Posteriormente fueron caracterizadas en primarias, secundarias y terciarias, de acuerdo a la clasificación por origen (Blom, 1950). A los acrosomas se los clasificó según Pursel y col (1972) en acrosoma íntegro (NAR); acrosoma dañado (DAR); acrosoma sin cápsula acrosomal (LAC) y acrosoma perdido (MAR).

### **3. Refrigeración**

Los eyaculados normales a la observación microscópica y que mostraban, como mínimo, 70 % de motilidad espermática progresiva y no más de 25 % de patologías espermáticas totales, se consideraron aptos y fueron sometidos a refrigeración a 15 – 17° C.

Para ello, se estimó el número de dosis inseminantes a obtener de acuerdo a la concentración total, y teniendo en cuenta que por dosis inseminante, se necesitan  $3 \times 10^9$  espermatozoides totales. Cada eyaculado se homogeneizó con un agitador magnético, se diluyó en diluyente de refrigeración comercial de larga duración (MRA®, Kubus, Madrid) y se refrigeró hasta alcanzar los 15 – 17° C, temperatura a la que se lo almacenó durante 6 días como máximo.

#### **4. Evaluación de la morfología espermática postrefrigeración**

Para estudiar la morfología espermática, inmediatamente post refrigeración se fijó 1 ul de semen diluido proveniente de cada muestra en 50 ul de FST. Posteriormente, una gota de esta muestra húmeda se colocó entre porta y cubreobjeto y se la observó en microscopio de contraste de fases a 1200 X, contando en guarda griega sobre un total de 100 espermatozoides. Las morfoanomalías presentes en cada muestra se clasificaron y cuantificaron de igual manera que en el semen fresco.

#### **5. Análisis estadísticos**

Se realizó análisis descriptivo de los datos e inferencial mediante un Análisis de la Varianza. Como la variable en estudio fue medida en porcentaje, para que se cumplieran los supuestos del ANOVA, se aplicó la transformación arco seno.

Para cada patología, individualmente, se utilizó un Diseño de Medidas Repetidas con dos factores, aleatorio: cerdo con 10 niveles y repetido: semen fresco y refrigerado. A las muestras se las consideró como anidadas dentro de cada cerdo y cruzadas con los niveles de semen (Winner et al, 1991).

Además se realizó un Análisis de Diferencias de Medias para muestras apareadas (Test t-apareado) a fin de comparar semen en cada patología, considerando 10 observaciones (variable es el porcentaje promedio por cerdo) (Montgomery, 1991).

Para estudiar el comportamiento de todas las patologías en relación con semen fresco y refrigerado, se utilizó un Diseño de medidas repetidas con dos factores repetidos: patología y semen. (Winner et al, 1991).

Para comparar a las patologías entre si se aplicó el test a Posteriori de Tukey. (Kuehl, .2001).

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para  $p \leq 0.05$ .

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Todas las muestras resultaron aptas para refrigerar y los valores de los parámetros evaluados en el semen fresco coincidieron con los señalados por diversos autores (Crabo, 1997; Flowers, 1998; Johnson y col., 2000 y Rozeboom, 2004). No obstante, a los fines inherentes a este trabajo, se hará referencia únicamente los datos correspondientes a patologías espermáticas.

## Semen fresco

El 9.14 % de los espermatozoides examinados presentaron anomalías (Tabla N° 1). Este resultado fue algo menor a los señalados en otros trabajos (Serrano y col., 1989; Serrano y col., 1996; Crabo, 1997; Flowers, 1998; Rozeboom, 2004, Rueda y col. 2006; González y col., 2008). Así, Rueda y col. (2006) en granjas cubanas de similares características encontraron 10.30 %, mientras que Serrano y col., (1996), en clima tropical, observaron un porcentaje aún mayor (15,83%). No obstante, todas se encuentran dentro de los valores normales, ya estudios previos se estableció que el porcentaje de anomalías admitidas en el eyaculado normal del verraco, varía del 7 al 30 %, con un valor promedio de 17% (Martín Rillo, 1982; Gibson, 1983; Flowers, 1998; Crabo, 1997; Rozeboom, 2004). Las variaciones en los valores promedio de anomalías espermáticas en el semen fresco de verracos normales, pueden obedecer a numerosas causas individuales y de manejo en esta especie (Rozeboom, 2004).

Estudiando a cada patología en particular no se encontraron alteraciones en los acrosomas (0,00%), mientras que otros autores que hallaron entre 1 – 5 % de acrosomas anormales (Serrano y col., 1996; Rueda y col., 2006).

Se observaron muy pocos defectos de cabeza espermática (0,48 %), cantidad considerablemente inferior a las señaladas por Serrano y col. (1996) y Rueda y col. (2006) y que se encontraban dentro de los valores considerados como aceptables por Bonet y col. (1998).

Se observó que la mayor proporción de patologías se ubica a nivel de la cola del espermatozoide (4.27 %), aunque la proporción hallada está dentro de los valores normales, donde las anomalías de cola no superan el 10 % (Lewis, 1995). En cada zona de la cola espermática se observó diferente incidencia de patologías (1.41 % en cuello y pieza media, 2.23 % en pieza principal y 0.64 % en pieza final); en discordancia con otros autores que hallaron aproximadamente 4 % de anomalías en cuello y pieza media (Serrano y col., 1996; Rueda y col., 2006). Sumando los resultados individuales de pieza principal y terminal, para poder compararlos con los informados como patologías de cola por los demás autores (Serrano y col., 1996; Rueda y col., 2006), los valores siguen siendo inferiores a los reportados por ellos.

Serrano y col. (1989), encontraron que el 30 % de las anomalías, correspondían a cuello y pieza intermedia y entre éstas, el 95 % eran inserciones abaxiales.

En cuanto a las gotas citoplasmáticas, el porcentaje de GCP fue menor (0.99 %) que el de GCD (3.39 %). En tanto que Serrano y col. (1996), encontraron 3, 62 %, sin diferencias entre ellas, en concordancia con Martín Rillo (1982). Y difieren con los de Rueda y col. (2006), quienes refirieron 4.13 % de patologías de cola y 3.62 % de gotas en general, de las cuales, el 40.38 % eran gotas proximales y el 59.6 % distales.

**Tabla N° 1.** Porcentajes promedio y error estándar de patologías espermáticas totales (PET), patologías de cabeza (PCa), de acrosoma (PA), de cuello y pieza media (PPM), de pieza principal (PPP) y de pieza final (PPF), gota citoplasmática proximal (GCP) y gota citoplasmática distal (GCD), hallados en las muestras de **semen fresco** de verracos usados para inseminación artificial. n= 10

Verraco	% PET (X ± SE)	% PCa (X ± SE)	% PA (X ± SE)	% PPM (X ± SE)	% PPP (X ± SE)	% PPF (X ± SE)	% GCP (X ± SE)	% GCD (X ± SE)
N° 1	10.22 ± 3.43	0.87 ± 0.33	0.00 ± 0.00	3.85 ± 1.79	0.00 ± 0.00	0.35 ± 0.17	3.15 ± 1.75	2.00 ± 0.90
N° 2	9.25 ± 3.52	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	5.20 ± 1.91	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.05 ± 1.79
N° 3	10.17 ± 1.75	2.05 ± 0.82	0.00 ± 0.00	3.87 ± 1.79	0.00 ± 0.00	1.55 ± 0.78	0.00 ± 0.00	2.70 ± 0.99
N° 4	2.45 ± 0.43	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.05 ± 10.39	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.40 ± 0.44
N° 5	9.56 ± 1.99	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.19 ± 1.20	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.50	4.37 ± 1.00
N° 6	4.70 ± 1.93	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.80 ± 1.74	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.90 ± 0.92
N° 7	11.39 ± 2.10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.15 ± 0.42	1.47 ± 1.72	3.35 ± 1.45	0.00 ± 0.00	5.41 ± 1.45
N° 8	14.23 ± 2.95	1.90 ± 0.83	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.28 ± 1.24	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.05 ± 1.90
N° 9	10.51 ± 2.63	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.15 ± 1.92	1.05 ± 0.46	2.31 ± 0.98	1.00 ± 0.47

<b>Nº 10</b>	8.87 ± 2.15	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.37 ± 0.17	0.00 ± 0.00	3.47 ± 1.66	5.02 ± 1.79
<b>Total</b>	9,14 ± 1.05	0.48 ± 0.20	0.00 ± 0.00	1,41 ± 0.65	2,23 ± 0.71	0.63 ± 0.31	0.99 ± 0.49	3.39 ± 1.16

Al tipificar las patologías espermáticas cuantificadas en el semen fresco y clasificarlas según su origen (Blom, 1950), se pudo observar que la mayoría eran de tipo primario, es decir producidas durante la espermatogénesis, a excepción de la gota citoplasmática distal, que es una falla madurativa que se produce a nivel epididimario (Lewis, 1995), y por lo tanto, se ubica en el grupo de las patologías secundarias.

Entre las anomalías de cabeza, las más frecuentes fueron desprendidas normales; estrechas y elongadas. Las dos últimas son consideradas primarias, mientras que las cabezas sueltas pueden ser primarias, secundarias o terciarias.

En cuello y pieza intermedia, el mayor porcentaje correspondió a la inserción abaxial. En pieza principal se encontraron segmentos doblados, asociados o no a gota citoplasmática distal, anomalía de tipo secundario. En pieza final la mayor proporción de anomalías fueron de dos tipos, extremo final enrollado y extremo final doblado, que pueden ser de origen primario o secundario. Todas estas observaciones coincidieron con las realizadas por otros investigadores (Hancock y Howel, 1959; Knoll y Kastyak, 1982; Serrano y col., 1996.)

### **Semen refrigerado**

Los resultados de la evaluación de las patologías espermáticas en el semen refrigerado, pueden observarse en la Tabla Nº 2.

De un total de 48.000 espermatozoides examinados microscópicamente, el 15.30 % presentaron anomalías. De éstos, el 1.75 % fueron patologías de cabeza, donde la mayor proporción de cabezas desprendidas normales, estrechas, elongadas y sueltas.

El 1.03 % de fueron anomalías de acrosoma, y el 100 % de ellos correspondieron al tipo DAR (Pursel y col., 1972). Estos resultados se contraponen a los de González Peña y col. (2008), que encontraron 19,26 % de acrosomas anormales sin diferencias significativas con el semen fresco. El porcentaje de acrosomas normales, inmediatamente post refrigeración debe ser alto, porque el acrosoma es una de las estructuras espermáticas más

susceptible a sufrir daño después de diluido el semen. (Kommisrud y col., 2002). A las 72 horas de almacenamiento a 16° C, se observó entre 7 % (González Peña y col. 2008) y 9 % de acrosomas dañados (Kommisrud y col., 2002).

**Tabla N° 2.** Porcentajes promedio de patologías espermáticas totales (PET), patologías de cabezas (PCa), de acrosoma (PA), de cuello y pieza media (PPM), de pieza principal (PPP) y de pieza final de la cola (PPF), gota citoplasmática proximal (GCP) y gota citoplasmática distal (GPD), hallados en las muestras de semen porcino **refrigerado**. N= 10

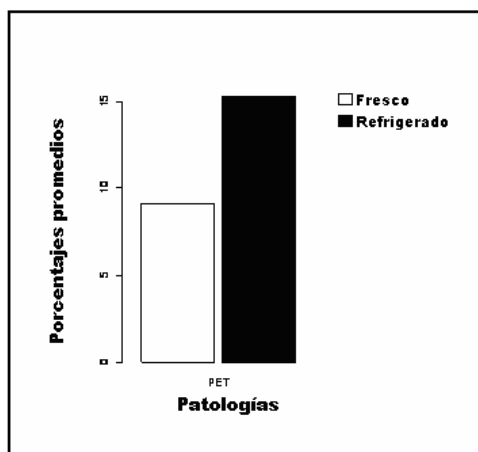
Verraco	% PET (X ± SE)	% PCa (X ± SE)	% PA (X ± SE)	% PPM (X ± SE)	% PPP (X ± SE)	% PPF (X ± SE)	% GCP (X ± SE)	% GCD (X ± SE)
Nº 1	12.51 ± 1.91	3.42 ± 1.12	0.25 ± 0.17	3.58 ± 1.13	0.00 ± 0.00	0.40 ± 0.18	2.61 ± 0.68	2.25 ± 0.84
Nº 2	11.81 ± 0.94	0.85 ± 0.46	0.07 ± 0.04	4.43 ± 1.32	0.85 ± 0.46	0.82 ± 0.50	0.00 ± 0.00	4.77 ± 0.99
Nº 3	17.28 ± 1.83	3.01 ± 0.79	1.91 ± 0.55	2.89 ± 0.67	5.22 ± 1.33	1.55 ± 0.78	0.00 ± 0.00	2.70 ± 0.99
Nº 4	11.66 ± 1.29	0.20 ± 0.10	0.37 ± 0.18	2.55 ± 0.83	6.34 ± 1.09	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.20 ± 0.84
Nº 5	11.62 ± 1.49	0.00 ± 0.00	0.97 ± 0.53	3.06 ± 0.78	3.70 ± 0.85	1.53 ± 0.56	0.00 ± 0.00	2.35 ± 0.83
Nº 6	12.96 ± 2.37	0.30 ± 0.18	1.80 ± 0.84	4.80 ± 1.29	4.11 ± 1.40	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.33	1.89 ± 0.68
Nº 7	21.91 ± 2.25	2.40 ± 0.96	1.80 ± 0.84	5.06 ± 1.16	3.63 ± 1.05	4.26 ± 1.12	0.15 ± 0.10	4.61 ± 1.18
Nº 8	23.39 ± 2.60	5.46 ± 1.20	1.91 ± 0.45	4.36 ± 1.01	5.85 ± 1.52	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.61	4.80 ± 1.59
Nº 9	17.85 ± 2.60	0.50 ± 0.35	0.00 ± 0.00	3.43 ± 1.03	4.67 ± 1.33	3.95 ± 1.18	3.03 ± 0.79	2.25 ± 0.85
Nº 10	12.06 ± 1.22	1.38 ± 0.69	1.27 ± 0.58	0.00 ± 0.00	0.92 ± 0.48	0.35 ± 0.17	4.75 ± 0.98	3.39 ± 0.97
<b>Total</b>	15.30 ± 1.42	1.75 ± 0.58	1.03 ± 0.42	3.42 ± 0.92	3.53 ± 0.95	1.29 ± 0.45	1.16 ± 0.35	3.12 ± 0.98

El 8.24 % de las anomalías se localizaron en la cola espermática. Y el segmento que presentó menor proporción de patologías fue la pieza final (1.29%), mientras que las piezas principal y media mostraron casi la misma cantidad de patologías (3.42 y 3.53 %, respectivamente. Entre las anomalías de cola se hallaron patologías primarias semejantes a las observadas en semen fresco y también algunas que pueden obedecer a causas secundarias o terciarias, como colas dobladas simples y en látigo, lo que permite suponer que fueron provocadas por la técnica de conservación

El 4.28 % de las patologías fueron gotas citoplasmáticas. De éste porcentaje, el 1.16 % correspondían a GCP y el 3.12 % a GCD.

### Comparación entre semen fresco y refrigerado

Como puede observarse en el Gráfico 1 y la Tabla N° 3, los porcentajes promedio de patologías espermáticas totales en el semen refrigerado (15.30 %) fueron un 6.16 % más altos que los del semen fresco (9.14 %) ( $p=0.00022$ ). Esto era esperable ya que la técnica de refrigeración, aunque sea realizada en las mejores condiciones, siempre implica un daño espermático (Pérez Marcos y col., 1991).



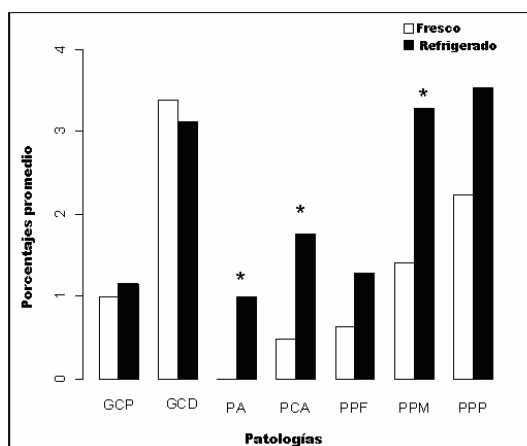
**Gráfico N° 1.** Comparación de los porcentajes promedio de patologías espermáticas totales (PET) hallados en las muestras de **semen fresco y refrigerado** de verracos usados para inseminación artificial. n= 10

Comparando cada tipo de patología de manera individual se observó el comportamiento de cada una de ellas en el semen fresco y refrigerado (Tabla N° 3 y Gráfico 2).

**Tabla N° 3.** Porcentajes promedio y error estándar de patologías espermáticas totales (PET), patologías de cabezas (PCa), de acrosoma (PA), de cuello y pieza media (PPM), de pieza principal (PPP) y de pieza final de la cola (PPF), gota citoplasmática proximal (GCP) y gota citoplasmática distal (GCD), hallados en las muestras de **semen fresco y refrigerado** de verracos usados para inseminación artificial. n= 10

SEMEN	PET (%)	PCa (%)	PA (%)	PPM (%)	PPP (%)	PPF (%)	GCP (%)	GCD (%)
<b>Fresco</b>	9,14 ± 1.05a	0.48 ± 0.26c	0.00 ± 0.00e	1,41 ± 0.65g	2,23 ± 0.79	0.63 ± 0.35	0.99 ± 0.45	3.39 ± 0.57
<b>Refrigerado</b>	15.30 ± 1.42b	1.75 ± 0.56d	1.03 ± 0.25f	3.42 ± 0.46h	3.53 ± 0.70	1.29 ± 0.50	1.16 ± 0.37	3.12 ± 0.54

Sin letras no se detectaron diferencias significativas. Letras diferentes indican diferencias significativas: a – b= (p=0.00022); c – d (p= 0.008); e – f (p= 0.003); g – h (p= 0.02).



**Gráfico N° 2.** Comparación de los porcentajes promedio de patologías de cabeza (PCa), de acrosoma (PA), de pieza media (PPM), de pieza principal (PPP) y de pieza final de la cola (PPF), gota citoplasmática proximal (GCP) y gota citoplasmática distal (GCD), hallados en las muestras de **semen fresco y refrigerado** de verracos usados para inseminación artificial. n= 10

Algunas de las patologías espermáticas se presentaron en mayor porcentaje en el semen refrigerado.

Las anomalías de cabeza fueron mayores en el semen refrigerado (p= 0.008). Por tipificación se pudo advertir que estas diferencias eran provocadas por anomalías del tipo cabezas sueltas normales (Larsson, 1986; Althouse, 1997), las cuales pueden ser de origen primario, secundario o terciario (Blom, 1950). En este caso, inferimos que corresponden al tercer grupo, porque se evidenciaron recién después de la refrigeración.

De igual manera, en el semen refrigerado se nota la aparición de acrosomas anormales, aunque en bajo porcentaje (1,04 %), mostrando diferencias estadísticamente significativas con el semen fresco ( $p= 0.003$ ). El tipo de lesión acrosomal observado correspondió a DAR (borde apical dañado) que se asocia a efectos térmicos débiles (Pursel y col., 1972).

Con respecto a las patologías de cola, en el semen refrigerado se observó, en las tres porciones, un incremento de los defectos con relación al semen fresco, aunque con valores escasamente significativos en pieza media ( $p= 0.02$ ) y no significativos a nivel de pieza principal y final.

Los porcentajes GCP (1.16 %) y de GCD (3.12 %) del semen refrigerado no mostraron diferencias significativas con respecto a los del semen fresco (0.99 % y 3.39 %, respectivamente), lo cual era esperable ya que nunca son anomalías de origen terciario.

Cuando se analizó la interacción entre verracos y tratamientos del semen, en las patologías de cabeza, acrosoma, pieza final y gota citoplasmática distal se observó interacción no significativa entre verracos y tratamiento del semen, lo que muestra que el comportamiento de la patología en todos los verracos es igual según sea el tipo de procesamiento. Mientras que en las patologías de cuello y pieza principal, pieza media y gota citoplasmática proximal se observó interacción significativa entre verraco y tratamiento del semen, lo cual indica que el comportamiento de la patología varía entre verracos.

Además en las patologías de cabeza, acrosoma, pieza final y gota citoplasmática distal se encontró variabilidad estadísticamente significativa entre verracos (factor aleatorio). En concordancia con Mazzarri y Fuentes (1978) y Fuentes y col. (1989), quienes observaron un amplio rango entre las características espermáticas, debido a las grandes variaciones individuales por efectos de factores intrínsecos (raza y edad) y extrínsecos (clima y manejo).

Tal como se esperaba el porcentaje de patologías primarias y secundarias no varió significativamente entre semen fresco y refrigerado. Sólo se observó incremento de algunas anomalías de tipo terciario, posiblemente influenciadas por el procesamiento. Ello debido a que todas las células espermáticas son sensibles a los cambios térmicos, y las del porcino aún más, por lo que sufren daños durante el proceso de refrigeración, aunque más leves que en la criopreservación (Pérez Marcos, 1991).

## CONCLUSIONES

- El porcentaje de anomalías espermáticas es mayor en semen refrigerado que en fresco.
- La refrigeración provoca leves alteraciones en la morfología espermática, las cuales se pueden calificar, cuantificar y diferenciar de las propias del semen fresco mediante técnicas de evaluación microscópicas de escasa complejidad.
- Existen variaciones individuales entre verracos en cuanto al tipo y número de patologías espermáticas observadas en su semen fresco y refrigerado.

## BIBLIOGRAFÍA

- **Acosta, M.; M. Rueda y R. Perdigón. (2007).** Comparación de dos técnicas en la determinación de morfo anomalías del semen porcino. Rev. Unell. Cienc. Tec. 25: 32 – 39.
- **Althouse, G. C. (1997).** Optimizing productivity of the A.I. boar. Proc. Of the North Carolina Healthy Hogs Seminar. [Http://mark.asci.ncsu.edu/healthyhogs/book1997/althouse2.htm](http://mark.asci.ncsu.edu/healthyhogs/book1997/althouse2.htm). (Consultada el 28 de agosto del 2009)
- **Barth, A. D. y R. J. Oko (1989).** Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University. Press/Ames. 285 pgs.
- **Barrera Toro, X. y C. Buxadé Carbó. (2007).** Exigencias actuales de calidad del semen de verraco. Mundo Ganadero, 196:
- **Blom, E. (1950).** A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. Fertil Steril. 1: 176 - 177.
- **Bonet, S.; Pinart, E.; Briz, m.; sancho, S. y Escuder, M. (1998).** Aportación al conocimiento de la criptorquidea espontánea abdominal y unilateral en porcinos. Análisis microscópico del eyaculado. Revista de porcicultura 18 (178) 91 -115.
- **Crabo, B. G. (1997).** Reproductive examination and evaluation of the boar. Current Therapy in Large Animal Theriogenology. W. B. Saunders, Philadelphia. 664 – 670.
- **Decuadro- Hansen, G. (2004).** Resultados prácticos da inseminação pós ou trans-cervical em suínos. Anais 2º Congresso latinoamericano de suinocultura – 4º congreso de suinocultura do MERCOSUL. 19 – 22.
- **Evenson, D.P.; L. Thompson, y L. Jost, (1994).** Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. Theriogenology 41: 637 - 651.
- **Flowers, W. L. (1998).** Management of Reproduction. In: Progress in Pig Science, eds. Wiseman, J., Varley, M. y Chadwick, J. 18: 383 – 405.

- **Fuentes, A.; G. Serrano; C. Reguero y A. Valle (1989)**. Efecto de la edad y raza sobre las características reproductivas de verracos púberes. *Zootecnia Tropical*. Vol. VIII (1 - 2): 119 - 135.
- **Gadea, J.; C. Matá, y X. Lucas (1998)**. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.* 54: 95 - 108.
- **Gadea, J.; E. Sellés; M. A. Marco (2004)**. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reproduction in Domestic Animals*. 39: 303 – 308.
- **Gadea, J. (2005)**. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, 63: 431 - 444.
- **Galli, A. y M. Bosisio, (1988)**. Quality of semen stored at +15/16°C is related to fertility of artificially inseminated swine. *Theriogenology*. 30: 1185 - 1190.
- **García Casado, P., R. Sala Echave, G. Reguera, B. Pérez Llano. (2007)**. Nuevas tecnologías en inseminación artificial porcina. *Avances en Tecnología Porcina*, 4 (3): 118-126
- **García-Casado, P., C. López, B. Pérez-Llano, R. Hernández, J. Ibáñez, J. y J. Gosálvez, (2010)**. Mejora de la calidad seminal en inseminación artificial. *Producción*.225.
- **García Ruvalcaba, J. A.; B. D. Corcuera; S. La Puente; A. Sagués y S. Martín Rillo, (1997b)**. Evaluación práctica del semen. Importancia de los resultados de fertilidad. Memoria del V simposio Internacional de Reproducción e I. A en porcinos. México. Editado por Dr. Alberto Stephan. 27 – 36.
- **Gibson, C. D. (1983)**. Clinical evaluation of the boar for breeding soundness phisical examination and semen morphology. *Continuing Education Article N° 7*, s 244. Vol. 5.
- **Gonzalez Peña, D; J. Collazo, J. Martínez , N. Díaz ,R. Cruz ,R. J. L. Hernández (2008)**. Efecto de la temperatura de conservación sobre la calidad del semen porcino en estado fresco refrigerado. <http://www.midiatecavipec.com/porcicultura/porci201205.htm>. Consultada el 23 de septiembre del 2009)
- **Hammerstedt, R. H. (1996)**. Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action. [Animal Reproduction Science](#), 42 (1): 77 - 87.
- **Hancock, J. L. (1952)**. The morphology of bull spermatozoa. *J. Exp. Biol.* 29: 445.
- **Hancock, J. L. (1957)**. The morphology of boar spermatozoa. *J. Royal Microsc. Soc*: 84 – 97.
- **Hancock, J. L. y G. J. R. Howell. (1959)**. The collection of boar semen. *Vet. Rec.* 71: 664.
- **Johnson, L. A.; J. G. Aalbers y H. J. G. Groote (1988)**. Artificial insemination of swine: Fecundity of boar semen stored in Beltsville Thawing Solution (BTS), modified modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Zuchthyg*, 23: 49 - 55.

- **Johnson, L. A.; K. F. Weitze; P. Fiser; W. M. C. Maxwell (2000).** Storage of boar. *Animal Reproduction. Science*, 62 (1 – 3): 143 - 172.
- **Kommisrud, E.; H. Paulenz; E. Selested; I. S. Grevle. (2002).** Influence of boar and Semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen store for five days. *Acta. Vet. Scand.* Vol 43 (1): 49 - 55.
- **Knoll, P.; Y. L. Kastyak (1982).** Seasonal changes in the qualitative and quantitative characters of boars semen and its fertilizing ability. *Animal Breeding Abstracts* 50 (3): 192. (1509 Abstr.).
- **Kubus S. A. (1999).** Gestión de Centros de Inseminación Artificial Porcina (MR-A Win Pro), Versión 1.0. 200 pgs.
- **Kuehl, R. (2001).** "Diseño de Experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación 2ª ed. Thomson Learning, Inc. México.
- **Larsson, K. (1986).** Evaluation of boar semen. En: *Current therapy in theriogenology*. Eds. Morrow, D. A. 972 - 975.
- **Lewis, D. G. (1995).** Procedures for collecting, evaluating and diluting boar semen. In: *Symposium Internacional de Reproducción e Inseminación Artificial Porcina*. Madrid, 155 -175.
- **Martín Rillo, S. (1982).** Inseminación artificial porcina. En *reproducción e Inseminación Artificial Porcina*, Primera Edición. Editorial Aedos. Barcelona. 307 pgs.
- **Martínez E. A.; S. Ruiz; S. J., Sánchez R.; C. García; S. Martín R. (1986).** Factores que afectan a la inseminación artificial porcina. *An. Vet. (Murcia)*. 2: 115 - 120.
- **Martínez, E.; J. M. Vazquez, J. Roca (2010).** Nuevas técnicas de inseminación artificial con semen fresco en la especie porcina <http://www.3tres3.com>
- **Mazzarri, G. y A. Fuentes (1978).** Características espermáticas de los verracos bajo condiciones tropicales. *Ciencias Veterinarias*. Vol. VIII. N° 4: 1133 - 1139.
- **Pérez Marcos, C.; R. Sánchez; M. Palacio; V. G. Pursel; T. Pérez García y S. Martín Rillo (1991).** Effects of dilution rate on the motility and acrosome morphology of boar spermatozoa stored at 15° C. *Reproduction in Domestic Animals*. 26: 112 – 116.
- **Pursel, V. G.; L. A. Johnson y G. B. Rampacek. (1972).** Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science*, 34: 278 - 283.
- **Rozeboom, K. (2001).** Factores importantes en la conservación de la calidad del semen porcino. *Rev. Cerdo/ Swine*. 4 (41): 29 – 30.
- **Rozeboom, K. J. (2004).** Evaluating boar semen quality. *Animal Science Facts. Extension Swine Husbandry*. Publication number ANS 00-812s. North Carolina State University. <http://mark.asci.ncsu.edu/publications/factsheets/812s>. htm. (Consultada 28 de agosto 2009)
- **Rueda, M.; T. Arias, N. Caballero, M. Tosar y M. J. Acosta. (2006).** Análisis de la calidad espermática de sementales porcinos en dos tipos de

porcicultura cubana. Revista Computadorizada de Producción Porcina. Volumen 13 (Número 1).

- **Sellés Soriano, E. (2008)**. Análisis de la funcionalidad de los espermatozoides porcinos refrigerados y congelados. Facultad Veterinaria. Universidad de Murcia. Mención doctorado Europeo. 2008. <http://www.tesisenred.net/TDR-0115109-091907/> (Consultada 10 de septiembre 2009).
- **Serrano, G. L.; A. Fuentes; C. Reguero, y A. Valle (1989)**. Estudio de las anomalías espermáticas de los verracos en relación a raza y época. Zootecnia tropical. Vol. VII (1 y 2): 93 - 117.
- **Serrano, G.; A. Fuentes P.; G. Sosa; A. Valle y C. Regueiro (1996)**. Estudio de las anomalías espermáticas del verraco en relación con raza, tipo y época en Venezuela. Zootecnia Tropical, 14(1): 17 - 34.
- **Tardif, S.; J. P. Laforest; N. Cormier; J. L. Bailey (1999)**. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. Theriogenology; 52 (3): 447 - 59.
- **Waberski D., G. Dirksen, K. F. Weitze, C. Leiding, R. Hang (1990)**. Effect of sperm motility and morphology on the fertility of AI boars in a field trial. Tierärztl. Prax. 18: 591 - 594.
- **Waberski D., S. Meding, G. Dirksen, K. F. Weitze; C. Leiding y R. Hahn (1994)**. Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen, Anim. Reprod. Sci. 36: 145 - 151.
- **Woelders H. (1991)**. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. En: Boar semen preservation II. Ed. Johnson L.A., Rath, D. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 145 - 164.
- **Weitze, K. F. (1990)**. Long- term storage of extended boar semen. *Reprod. Dom. Anim*, Suppl 1: 231 - 253.
- **Winner, B.J.; Brown, D; Michels, K. (1991)**. "Statistical Principles in Experimental Design". 3ª ed. Mc.Graw-Hill, Inc
- **Zeuner, A. (1992)**. On the relations between sperm morphology and the fertility of boar semen. 12th Int. Congr. Anim. Reprod., The Hague, The Netherlands. 3: 1617 - 1619.