

## OPTIMIZACIÓN DE LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN PORCINO CON EL DILUYENTE CUBANO DICIP

Madelyn Rueda<sup>1</sup>, R. Perdigón<sup>1</sup>, Teresa Arias<sup>1</sup>, D. Mendoza<sup>1</sup>, J.A. Benítez<sup>2</sup>, C. Lemus<sup>2</sup> y M. Tosar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Porcinas. Gaveta Postal No. 1. Punta Brava. La Habana, Cuba  
email: mrueda@iip.co.cu

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la Cultura "Amado Nervo". Tepic, México  
email: drcllemus@yahoo.com.mx

### RESUMEN

*Se comparó mediante estudios de motilidad de espermatozoides, la conservación de semen porcino en dos diluyentes cubanos del tipo dicip mediante un diseño de parcela dividida, en el que la parcela principal fue el tipo de diluyente, y la subparcela, el tiempo de conservación (0, 24, 48 y 72 horas). Se utilizaron 230 eyaculados de 20 cerdos del genotipo CC21, con edades comprendidas entre 14 y 24 meses, y una frecuencia de monta de cada cuatro días. Se utilizó un maniquí para la extracción por el método de la mano enguantada. Se evaluó la calidad espermática a través de los indicadores de volumen, motilidad, concentración espermática y calidad del movimiento del espermatozoide.*

*No hubo efecto significativo ( $P < 0.05$ ) de parcela x subparcela para la motilidad de espermatozoides. La resistencia espermática manifestó diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) a las 24, 48 y 72 horas postdilución entre tipos de diluyentes, con un mejor comportamiento en el nuevo diluyente (dicip-m) utilizado. Se obtuvieron motilidades de 68.5 y 55.8%, 56.8 y 37.1% y 38.9 y 19.6%, a las 24, 48 y 72 horas de conservación respectivamente para los tratamientos con dicip-m y dicip. El dicip-m mostró una mejor supervivencia del esperma al compararlo con el dicip control. La alta motilidad espermática del dicip-m pudiera explicarse por un mejor valor del pH en el medio, el cual fue casi neutro (6.9) en contraste con otro diluyente dicip (6.6). Así, no hubo efecto de tiempo de conservación en el pH del semen diluido con dicip-m ( $P > 0.05$ ); sin embargo, esto sí fue evidente ( $P < 0.001$ ) en el otro producto, el dicip que se utilizó como control ( $P < 0.001$ ).*

*Se caracterizó una nueva fórmula de diluyente para semen porcino. Se concluyó que el sistema de amortiguamiento del nuevo, dicip-m es más eficiente que el del control.*

**Palabras claves:** genotipo, calidad espermática, amortiguamiento, diluyente

**Título corto:** Diluyentes cubanos de semen porcino

## OPTIMIZATION OF PIG SEMEN CONSERVATION BY USING THE CUBAN EXTENDER DICIP

### SUMMARY

*Pig semen conservation in two Cuban extender of the dicip type was compared through spermatozoid motility according to a split-plot design where the type of extender was the main plot, and the time of conservation (0, 24, 48 and 72 hours) was the subplot. Two hundred and thirty ejaculates from 20 CC21 boars, of 14-24 months old and four days of mating intervals were used. A mannequin was employed for semen extraction by the gloved hand method. Semen quality was evaluated through semen volume, cell motility and concentration, and spermatozoid motility.*

*Sperm resistance had significant ( $P < 0.001$ ) differences at 24, 48 and 72 hours post-dilution between both types of extenders, the new extender, dicip-m showing a better result. Cell motility was 68.5 and 55.8%, 56.8 and 37.1%, and 38.9 and 19.6% at 24, 48 and 72 hours of semen conservation, respectively for the new dicip-m and the dicip extender. The dicip-m extender determined a better survival capacity of semen when compared to the control, corresponding to the old dicip type. The high spermatozoid motility found with dicip-m could be explained by the milieu pH value, which was near neutrality (6.9), with respect to the other dicip extender (6.6). Hence, there was no effect of conservation on the pH value of the semen extended with dicip-m ( $P > 0.05$ ); however, this was evident ( $P < 0.001$ ) in the other product, dicip, which was used as control ( $P < 0.001$ ).*

*A new extender formula for pig semen was characterized. It was concluded that the buffering system of the new dicip-m extender is more efficient than the control.*

**Key words:** pig, genotype, semen quality, buffering capacity, extender

**Short title:** Cuban extenders of pig semen

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la inseminación artificial porcina es una técnica reproductiva de amplia aplicación. Según las últimas estimaciones, en el mundo se realizan unas 19 millones de inseminaciones, de las cuales la totalidad (99%) se realiza con semen refrigerado a 15–20°C (Jhonson et al 2000). Entre los factores que han favorecido el desarrollo de esta técnica se encuentran las ventajas en la diseminación del material genético mejorado del verraco, unido a que los resultados obtenidos con esta técnica igualan, incluso mejoran los obtenidos en sistemas con monta natural (Gadea 2003).

El dicip es un diluyente cubano para semen porcino (Del Toro et al 1996), de corta duración, desarrollado a partir del diluyente ruso Kiev (Plisko 1965) el cual posteriormente fue modificado recibiendo otras denominaciones (EDTA, Merck I, Plisko, Guelph). Este diluyente fue ampliamente utilizado en Cuba en la década de los 80. Recientemente, con el objetivo de mejorar la conservación del semen, se modificó el diluyente cubano. Para ello se desarrolló un estudio en el laboratorio del Centro de Procesamiento de Semen Porcino, del Instituto, en el período comprendido de enero a noviembre del 2004.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las modificaciones realizadas al diluyente cubano de semen porcino dicip para mejorar la conservación del mismo. Los datos presentados fueron expuestos anteriormente por Rueda (2007).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se compararon dos tipos de diluyente de semen porcino, el dicip y el dicip-m, provenientes del Centro de Procesamiento de Semen, del Instituto. Se trabajó con un total de 230 eyaculados de 20 cerdos machos del genotipo CC21, con edades comprendidas entre 14 y 24 meses, los cuales tuvieron una frecuencia de monta de cada 4 días. El sistema de manejo, explotación, y alimentación se realizó según lo descrito en IIP (2001).

En la obtención de los eyaculados se utilizó un maniquí para la extracción seminal, y el método empleado fue el de la mano enguantada (Hernández 1976). El material se colectó en jarras de cerámica previamente atemperadas a 37°C, y se filtró la porción gelatinosa del semen con una gasa triple estéril. Con posterioridad a la recolección, se trasladó el material obtenido hasta el laboratorio para su análisis.

El semen fue conservado a temperatura entre 16-20°C en una nevera de conservación ad hoc. Cada eyaculado fue diluido en dos tipos de productos el dicip-m, con 74% de glucosa y bicarbonato sódico, y el dicip como tal, que fue empleado como control. Se usó un electrodo de vidrio para medir el pH de cada diluyente y del semen puro y diluido en ambos tratamientos. Aquellos eyaculados con olor y color no deseados, así como el que mostraba material aglutinado, fueron desechados. Se evaluó la calidad espermática a través de los indicadores de volumen, motilidad y concentración espermática (IIP 1998). El volumen del semen sin diluir fue medido en una probeta graduada, mientras que la concentración espermática se hizo mediante microscopía óptica con una cámara de Newbauer, mediante la dilución de 0.1 mL de semen puro en 10 mL de agua. La motilidad de los espermatozoides se hizo

observando las células contenidas en una gota del eyaculado. La calidad del movimiento del espermatozoide se examinó de acuerdo con la escala de 0 a 5 puntos (Magapor 1998), inmediatamente después de la extracción. En la tabla 1 se expone la nomenclatura usada para evaluar los parámetros estudiados de motilidad.

**Tabla 1. Parámetros establecidos para la evaluación de la motilidad en semen porcino**

Tipo <sup>1</sup>	Movimiento de los espermatozoides		Evaluación
1	Pobre: las cabezas quedan fijas, y sólo se mueven las colas, con poder para girar sobre sí mismas. Células sin movimiento progresivos		Pobre
2	Desplazamiento en círculos, y algunos progresivos		Regular
3	Progresivo y sinuoso		Buena
4	Progresivos y rápido		Muy buena
5	Progresivos muy rápidos, Presentes ondas de movimiento		Muy buena

<sup>1</sup> Establecido por Magapor (1998)

La tabla 2 muestra la composición química de los diluyentes utilizados en los tratamientos.

**Tabla 2. Composición química de los diluyentes de semen utilizados**

Composición	Diluyente de semen	
	dicip-m <sup>1</sup>	dicip
Glucosa anhidra	++	+++
Citrato sódico tribásico	+++	+++
EDTA	+++	+++
Bicarbonato sódico	+++	No
Antibiótico	+++	+++
pH	6.9	6.6

<sup>1</sup> Modificado con 74% de glucosa y bicarbonato sódico

Se tuvo en cuenta el por ciento de células patológicas y se midió la resistencia espermática del semen conservado (16°C) a las 24, 48 y 72 horas postdilución. Para medir la resistencia espermática se utilizó la motilidad de las células (vide supra). El cálculo de las dosis se realizó según la expresión descrita por del Toro (1999).

Se utilizó una diseño de parcela dividida en el que la parcela principal fue el tipo de diluyente y la subparcela, el tiempo de conservación, para comparar las medias de los dos tratamientos examinados mediante el análisis de varianza (Steel y Torrie 1980). Para el análisis de los datos se utilizó un modelo lineal general del paquete estadístico del SAS (1997).

## RESULTADOS

No hubo efecto significativo (P<0.05) de parcela x subparcela para la motilidad de espermatozoides. Los valores de los indicadores que se muestran en la tabla 3 se encuentran

dentro de las medias informadas por otros (Rozeboom 2001; Wlodzimierz 2004).

**Tabla 3. Indicadores de calidad espermática del semen puro e cerdos**

Indicadores	Media	EE ±
n	230	-
Volumen, mL	217.0	6.4
Motilidad, %	80.4	0.59
Tipo de movimiento <sup>1</sup>	4.1	0.05
Células, 10 <sup>6</sup> /mL	382.2	12.7
Patologías, %	5.1	0.19
Número de dosis	18.5	0.7

<sup>1</sup> Escala de 0 a 5 puntos (Magapor 1998)

En relación con la resistencia espermática a las diferentes horas en los tratamientos estudiados, se observó que existieron diferencias significativas (P<0.001) a las 24, 48 y 72 horas postdilución, siendo el de mejor comportamiento el diluyente utilizado en el tratamiento con dicip-m (tabla 4).

**Tabla 4. Resistencia espermática del semen diluido de cerdos**

Horas postdilución	Motilidad, %		EE ±
	dicip-m	dicip	
0	80.4 <sup>a</sup>	79.7 <sup>a</sup>	0.01
24	68.5 <sup>b</sup>	55.8 <sup>b</sup>	0.05***
48	56.8 <sup>c</sup>	37.1 <sup>c</sup>	0.01***
72	38.9 <sup>d</sup>	19.6 <sup>d</sup>	0.01***
EE ±	0.02***	0.02***	-

\*\*\* P< 0.001

<sup>ab</sup> Medias en la misma columna con diferentes letras difieren significativamente (P<0.05) entre sí

Se obtuvieron motilidades de 68.5 y 55.8%, 56.8 y 37.1% y 38.9 y 19.6%, a las 24, 48 y 72 horas de conservación respectivamente para los tratamientos de dicip sin modificación y modificado, respectivamente.

En la tabla 5 se presenta el resultado de medir el pH en semen puro y diluido.

**Tabla 5. Valores de pH del semen de cerdos**

Tipo de semen	pH		EE ±
	dicip-m	dicip	
n	230	230	-
Intacto	6.8	6.8	0.05
Diluido <sup>1</sup>	6.9	6.6	0.03***
EE ±	0.04	0.03***	-

<sup>1</sup> Promedio de tres tiempos de conservación de cada una de las muestras de semen

\*\*\* P< 0.001

En este caso los valores de la misma muestra de semen diluido para los distintos tiempos de conservación fueron agrupados. No hubo efecto de tiempo de conservación en el pH del semen diluido con dicip m (P>0.05); sin embargo, esto

sí fue evidente (P<0.001) con respecto al otro producto, el dicip que se utilizó como control

## DISCUSION

### Calidad espermática del semen de cerdos

En el nuevo diluyente ensayado, el dicip-m, existen cuatro reactivos que son comunes con respecto al control o dicip sin modificación. En las dos fórmulas se mantiene el principio del uso de la glucosa, citrato de sodio, EDTA y antibiótico como elementos necesarios para aportar los carbohidratos estabilizados para el metabolismo del espermatozoide (Pérez y Pérez 1985). La composición de la fórmula experimental coincide con el MR-A, diluyente desarrollado por Martin Rillo (1984) y con el BTS creado por Pursel y Johnson (1975), en que todos contienen bicarbonato de sodio en su composición, aunque el nivel de inclusión varía.

La disminución de la glucosa en la nueva formulación obedece a que el espermatozoide es capaz de utilizar otros sustratos como la fructosa presente en el plasma seminal a través de la fructolisis (Marin et al 2003). Es de señalar, que en este estudio se utilizó el eyaculado total. Igualmente la célula espermática utiliza además otra fuente de nutrientes, que es el citrato a través del ciclo de Krebs. En ausencia de otros sustratos energéticos los espermatozoides utilizan eficazmente el citrato y el lactato con un mayor potencial energético que la glucosa o la fructosa a través del ciclo de Krebs (Jones y Connors 2000).

Según Ballester (2000) un medio que contenga niveles altos de glucosa, siempre inferiores a los que contienen los diluyentes comerciales más ampliamente utilizados, y niveles relativamente bajos de lactato como fuente alternativa de energía, permite una conservación de los espermatozoides porcinos a temperaturas entre 15-17°C por un tiempo mayor a lo observado, incluso en diluyentes comerciales utilizados ampliamente, como el BTS. Por lo tanto, un diseño optimizado de las fuentes energéticas glucolíticas y no glucolíticas es imprescindible para la mejora de los diluyentes de semen porcino en refrigeración.

Uno de los problemas para la conservación del eyaculado porcino radica en la escasa capacidad amortiguadora del pH que ofrece el medio seminal (Gadea 2001). Este efecto negativo se puede neutralizar añadiendo al mismo, soluciones de hidróxido, citrato y bicarbonato de sodio, manteniendo así un pH entre 6.9 y 7.0, en coincidencia con lo planteado por Pérez y Pérez (1985) y Gadea (2004). Sin embargo, la fórmula que no posee hidróxido de sodio, asignándosele la propiedad neutralizadora al citrato y a bicarbonato de sodio (Moya 1987), evita el efecto higroscópico que produce el mismo, lo cual permite mezclar todos los reactivos en un paquete único. En este sentido, Ochoa (1999) y Gadea (2004) informaron que el citrato y el bicarbonato, a pesar de ser tampones simples, pueden combinarse aportando amplias posibilidades de acción amortiguadora, titulándose así en rangos más amplios de pH.

En el presente estudio, se superaron los resultados obtenidos por del Toro et al (1996), quien refiere para la raza sintética CC21 valores de 74.9%, 353.9 células x 10<sup>6</sup>/mL, 255.5 mL y 14.5 en cuanto a motilidad, concentración, volumen y número de dosis, respectivamente; destacando en su trabajo la superioridad del cerdo CC21 en comparación con otras razas.

Resultados similares obtuvieron Arias et al (2005) y Acosta et al (2006) al estudiar la calidad espermática de los sementales.

El por ciento de patologías totales se encontró por debajo del 20% informado por la literatura y se coincidió con Velásquez et al (1999), Kubus (1999) y Williams (2006) en que las principales patologías incluyen la presencia de gotas citoplasmáticas proximales y defectos en el flagelo espermático. Esto se debe a que los espermatozoides maduros se caracterizan por la presencia de gotas citoplasmáticas y durante la última fase de maduración en el epidídimo se produce la reabsorción de estas gotas. Según Levis (1995) podemos encontrar espermatozoides inmaduros en el eyaculado cuando hay un ritmo de extracción que provoca la aparición de espermatozoides provenientes de la cabeza del epidídimo por vaciamiento del cuerpo.

### Motilidad de los espermatozoides

Magapor (1998) y Kubus (1999) clasificaron la calidad del movimiento con una puntuación de 0 a 5. Los resultados obtenidos aquí indican que la calidad del movimiento de los espermatozoides de los verracos estudiados fue muy buena. Martínez et al (1986) han referido que la motilidad de la fracción rica del espermatozoide es idónea para la inseminación artificial cuando está en un rango de un 75% con calidad de movimiento 3 en el momento de la recolección.

En este estudio se superaron los resultados obtenidos por Del Toro et al (1996) al evaluar el comportamiento del diluyente cubano dicip frente al Plisko, y los de Moya et al (1987) al estudiar la solución cimave. Moya et al (1987) refirieron motilidades de 72.5 y 55.5% a las 0 y 12 horas de conservación. Estos resultados coinciden con Flowers (1995), quien plantea que con el empleo de dosis de 66.2% a 94.7%, la tasa de partos y el tamaño de la camada no sufren reducción, obteniéndose de 86.1 a 86.9% de efectividad económica y de 10.1 a 10.6 crías.

El dicip-m mostró una mejor supervivencia del esperma al compararlo con el dicip control, aunque la tendencia fue análoga en que en ambos diluyentes existe una disminución gradual de la motilidad espermática conforme avanza el período de conservación. Esto está influenciado por lo expresado por Levis (2000) y Kamp et al (2003), quienes refieren que el bicarbonato presente en el tratamiento con diip-m está prioritariamente destinado a contrarrestar el pH ácido del medio; si bien es conveniente que se mantenga una ligera acidez para favorecer la disminución del metabolismo oxidativo de las células espermáticas y estimular la anabiosis, dado que el ácido láctico producido en el metabolismo del nemaspermo altera el pH del medio y consecuentemente la supervivencia espermática.

Otros estudios (Cheminade et al 2002), indican que el lactato resultante de la fructólisis tiene importantes correlaciones con la motilidad espermática y que puede actuar como inhibidor de la misma. De esta forma la glucosa que contienen los diversos medios de conservación también es oxidada por los espermatozoides a través de la vía glucolítica. A medida que se incrementa el tiempo de conservación de los espermatozoides, los efectos del pH sobre la motilidad se hacen más evidentes.

La alta motilidad espermática del dicip-m pudiera explicarse por su interacción con el pH, el cual fue solamente ligeramente

ácido (6.9). Estos resultados concuerdan con lo referido por Weitze (1990) quien señala que los diluyentes con este promedio de pH obtienen un metabolismo menos activo, con lo que se logran mejores motilidades.

De acuerdo con los resultados de este trabajo se puede deducir que el sistema de amortiguamiento del dicip-m es más eficiente que la del dicip control.

### REFERENCIAS

- Arias, T., Rueda, M., Mendoza, D., Diéguez, F. y Morales, G. 2004. Apuntes sobre la aptitud ante el maniquí y calidad espermática de cochinatos L35 x Duroc, L35 x CC21 y CC21. Revista Computadorizada de Producción Porcina, 11(2):77-81
- Acosta, M., Perdígón, R., Rueda, M. y Arias, T. 2006. Influencia de la técnica de evaluación y el genotipo en la producción de dosis seminales para la inseminación artificial Porcina. Seminario Internacional de Porcicultura Tropical. La Habana. Versión electrónica disponible en disco compacto ISBN 959-0282-25-3
- Cheminade, C., Gautier, V., Hichami, A., Allaume, P. y Le Lannou, D. 2002. 1-O-alkylglycerols improve boar sperm motility and fertility. *Biology of Reproduction*, 66:421-8
- Del Toro, Y. 1999. Los Centros de Procesamiento de Semen como elemento para disminuir los costos de la producción porcina en Cuba. Revista Computarizada de Producción Porcina, 4(3):16-76
- Del Toro, Y., Arias, T., Diéguez, F., Morales, G. y Martínez, M. 1996. Nuevo diluyente conservador del semen porcino en estado fresco. Revista Computarizada de Producción Porcina, 3(1):57-61
- Flowers, W.L. 1995. Relationships between estimates of fertility and motility for porcine spermatozoa. *Animal Science*, 10(5):9-13
- Gadea, J. 2003. Los diluyentes de inseminación porcina. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(2):17-27
- Gadea, J. 2004. El uso de semen porcino congelado. *Mundo Ganadero*, 169:60-62
- Gadea J., Sellés, E., Tomás, P. y Ruiz, S. 2001. El valor del análisis seminal porcino en las condiciones de explotación comercial. *Revista ITEA*, 22: 829-831
- Hernández, J.J. 1976. Estudio comparativo entre vagina artificial y mano enguantada para la recolección del semen porcino. *Revista Cubana de Reproducción Animal*, 2:65-75
- IIP. 1998. Instructivo Técnico de Reproducción e Inseminación Porcina. Instituto de Investigación Porcina. La Habana, pp 58
- IIP. 2001. Procedimientos Técnicos para la Crianza Porcina. Instituto de Investigaciones Porcinas (IIP). La Habana, pp 139
- Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P. y Maxwell, W.M. 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62:143-172

- Jones, A.R. y Connor, D.E. 2000. Fructose metabolism by mature boar permatozoa. *Reproductive Fertility Development*, 12:355-359
- Kamp, G., Busselmann, G., Jones, N., Wiesnier, B. y Lauterwein, J. 2003. Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. *Reproduction*, 126:517-525
- Kubus. 1999. Gestión de Centros de Inseminación Artificial Porcina (MR-A Win Pro), Versión 1.0. Madrid, pp 200
- Landsverk, K. 2000. Packaging and distribution - their impact on fertility. In: *International Conference on Boar Semen Preservation*. (L.A. Jhonstson y H.D. Guthari, editores). Maryland, p 137-139
- Levis, D.G. 2000. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here!. In: *Semen Boar Preservation IV*. (L.A. Johnson y H.D. Guthrie, editores). Allen Press, In Company. Lawrence, p 121-128
- Levis, D.G. 1995. Procedures for collecting, evaluating and diluting boar semen. *Symposio Internacional de Reproducción e Inseminación Artificial Porcina*. Madrid, p155-175
- Magapor. 1998. Manual de Reproducción e Inseminación Artificial en el Cerdo. Magapor Sociedad Anónima. Barcelona, pp 100
- Martínez, E., Ruiz, S., Sebastián, J., Sánchez, R., García, C. y Martín Rillo, S. 1986. Factores que afectan el éxito de la inseminación artificial. porcina. *Anales de Veterinaria*, 2:115-120
- Martín Rillo, S. 1984. How artificial insemination is progressing in Spain. *Pig International*, May:24-28
- Marin, S., Chiang, K., Bassilian, S., Lee, W.N.P., Boros, L.G., Fernández-Novell, J.M., Centelles, J.J., Medrano, A., Rodríguez-Gil, J.E. y Cascante, M. 2003. *Febs Letters*, 554: 342-346
- Moya, A., Hernández, J. y Duvergel, O. 1987. Nuevo diluyente para ampliar el volumen seminal del eyaculado porcino. *Revista Cubana de Reproducción Animal*, 13(1):125-130
- Ochoa, G. 1999. Evaluación in vitro e in vivo de semen porcino conservado con diluyentes de larga duración. Tesis MSci. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, pp 59
- Pérez, A. y Pérez, F. 1985. *Reproducción Animal: Inseminación Artificial y Transplante de Embriones*. Editorial Científico Médica. Barcelona, pp 245
- Plisko, N.T. 1965. Un método para prolongar la viabilidad y la capacidad fertilizadora de espermatozoides del cerdo. *Svinovodstvo*, 9:37-41 (en ruso)
- Pursel, V.G. y Johnson, L.A. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*, 40:99-102
- Rozeboom, K. 2001. Factores importantes en la conservación de la calidad del semen porcino. *Cerdos/Swine*, 4(41):29-30
- Rueda, M. 2007. Optimización de la conservación del semen con el diluyente cubano para semen porcino dicip. Tesis MSci. Instituto de Investigaciones Porcinas. La Habana, pp 63
- SAS. 1997. SAS/STAC Software. Statistical Analysis System (SAS) Institute In Company. Cary, versión electrónica disponible en disco compacto
- Steel, R.G.D. y Torrie, J.H. 1980. *Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach*. Mc-Graw-Hill Book Company In Company. Toronto, pp 481
- Velázquez, I., Del Toro, Y., Castillo, R., Morales, G. y Benítez, E. 1999. Una nota sobre la influencia del control de los sementales sobre los indicadores de calidad seminal en cerdos. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 6(1): 55-58
- Weitze, K.F. 1990. Long-term storage of extended boar semen. *Reproduction of Domestic Animals. Supplement 1*: 231-253
- Wlodzimierz, S. 2004. As características sexuais dos machos influenciam o desempenho de suas filhas. *Revista Brasileira em Produção Suína*, 2(6):19-21
- Williams, S. 2006. O Cachaco: exames andrológico e de capacidade fecundante. *Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Suínos*, 4(16):10-15