

SEMEN CRIOPRESERVADO EN LOS PROGRAMAS DE INSEMINACIÓN EN LA ESPECIE PORCINA, ¿ALTERNATIVA O COMPLEMENTO AL SEMEN REFRIGERADO?

J. ROCA; M. HERNÁNDEZ, A. BOLARÍN, J.M^a VÁZQUEZ y E. MARTÍNEZ.

Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria.

Universidad de Murcia. 30071. Murcia.

1.- Introducción

Desde que en 1970, Polge y colaboradores, consiguieran las primeras camadas de lechones a partir de espermatozoides congelados-descongelados, el uso eficiente y rentable del semen criopreservado en los programas de inseminación artificial (IA) en la especie porcina sigue siendo un reto. Hoy, 35 años después, se abren nuevas perspectivas para la utilización comercial del semen criopreservado al obtenerse aceptables tasas de fertilidad inseminando con tan solo 1000 millones de espermatozoides. Ello es posible gracias a las mejoras en los protocolos de criopreservación, que permiten recuperar la funcionabilidad de un alto porcentaje de espermatozoides tras la descongelación, y a los nuevos procedimientos de inseminación, que permiten depositar los espermatozoides en las profundidades de los cuernos uterinos facilitando su llegada al oviducto.

A pesar de estos avances, la fertilidad y prolificidad del semen criopreservado es todavía sensiblemente más baja que la obtenida con el semen fresco o refrigerado. Actualmente, bajo las mismas condiciones de manejo reproductivo es muy difícil que con semen criopreservado podamos alcanzar los altos niveles de fertilidad y prolificidad característicos de la especie porcina cuando se utiliza semen fresco o refrigerado. Es más, me atrevería a decir que con semen criopreservado será difícil que consigamos igualar los resultados del fresco o refrigerado. Entonces, ¿existen hoy razones convincentes para utilizar el semen criopreservado en porcino? Esta pregunta admite diversas respuestas en función de los requerimientos de cada explotación de acuerdo a sus objetivos, necesidades y condiciones de manejo. Así, mientras para algunas no será interesante utilizar semen criopreservado, para otras puede ser un complemento al semen refrigerado. Finalmente, para un tercer grupo, el menos numeroso quizás, puede ser una alternativa a considerar para mejorar su productividad. Con el ánimo de que cada uno pueda contestarse dicha pregunta, pretendemos exponer que podemos esperar hoy en día del semen criopreservado y a cambio de que.

2.- Ventajas del semen criopreservado respecto al refrigerado

La técnica de criopreservación, al permitir conservar los espermatozoides por tiempo indefinido sin que pierdan su capacidad fecundante, ofrece algunas posibilidades inalcanzables para las otras técnicas más tradicionales de conservación, como es la refrigeración. Entre las ventajas a considerar de la criopreservación sobre la refrigeración, como procedimiento para conservar semen de porcino, deberíamos señalar las siguientes:

a.- Importación/exportación de dosis seminales:

Debido a restricciones sanitarias cada día es más difícil transportar animales vivos entre países e incluso entre regiones de un mismo país. Una alternativa es transportar los gametos de esos animales, es decir sus espermatozoides y/o los ovocitos. Referente a los espermatozoides, ya que la refrigeración solo mantiene su capacidad funcional durante cortos periodos de tiempo, no más de una semana en el mejor de los casos; la única alternativa viable hoy en día con garantías para transportar espermatozoides a largas distancias es mediante la criopreservación. Como hemos comentado anteriormente, los espermatozoides criopreservados pueden mantener su capacidad fecundante de forma indefinida. Salamon y cols., (1996) obtuvieron aceptables tasas de fertilidad en ovino con semen congelado 27 años antes. Además, actualmente existen contenedores apropiados para almacenar espermatozoides criopreservados y poderlos transportar con garantías a cualquier parte del mundo con cualquier medio de transporte (Figura 1). Estas cualidades de la técnica de criopreservación favorecen el comercio internacional de dosis seminales. Recientemente, se han publicado excelentes resultados de fertilidad, superiores al 70%, en cerdas inseminadas en Taiwán e Irlanda con semen criopreservado en Suecia (Eriksson y cols., 2002). El mercado latinoamericano ofrece interesantes posibilidades para las empresas españolas dedicadas a genética y el semen criopreservado puede ser un excelente medio para facilitar la exportación de determinadas líneas genéticas.



Figura 1.- Modelo de tanque de nitrógeno seco para el transporte de dosis espermáticas criopreservadas aceptado en cualquier medio de transporte, incluido el avión.

b.- Creación de bancos de dosis seminales:

Como hemos dicho, los espermatozoides pueden mantener su capacidad funcional de manera indefinida cuando se conservan a -196°C en tanques de nitrógeno líquido. Dichos tanques, dependiendo de su tamaño, permiten almacenar miles de dosis de semen formando lo que tradicionalmente se llama “bancos de dosis seminales”. Tradicionalmente, dichos “bancos” se han creado para conservar determinadas líneas genéticas, las cuales han perdido interés pero puede que lo recuperen en un futuro. Hoy son varias las empresas españolas de genética que disponen de “bancos de semen” para dicha finalidad. Sin embargo, en la actualidad disponer de un “banco de dosis seminales” puede ser una necesidad para cualquier explotación de porcino, sea o no de genética. Las razones son sanitarias, disponer de dosis suficientes de semen criopreservado, permite a las explotaciones autoabastecerse en aquellas situaciones en las que está prohibida la movilidad tanto de animales vivos como de material biológico. Situaciones, por desgracia, frecuentes en la especie porcina y normalmente relacionadas con brotes infecciosos.

c.- Gestión, planificación y operatividad de los centros de IA:

Los centros productores de dosis refrigeradas de semen deben mantener una producción constante a lo largo del año para satisfacer las posibles necesidades de las granjas a las cuales abastecen. Este compromiso crea algunas obligaciones tales como: (1) producir más dosis, en general, de las que posiblemente serán requeridas, al no tener la seguridad de cuantas serán solicitadas, dosis que si no son utilizadas deberán ser eliminadas; (2) producir dosis de semen procedentes de determinados verracos sabiendo que no todas serán utilizadas, y por lo tanto algunas deberán ser desechadas; y (3) la necesidad de elaborar dosis muchos fines de semana, con el consiguiente gasto añadido en personal.

La utilización rutinaria del semen criopreservado en los programas de IA favorecería la gestión de los centros de producción de dosis al minimizar las anteriores obligaciones. Así, por ejemplo, las dosis sobrantes, al estar criopreservadas, podrían ser almacenadas sin que perdieran su efectividad en cuanto a fertilidad. Además, no habría necesidad de elaborar dosis los fines de semana, siempre y cuando tuviéramos suficientes almacenadas en los tanques de nitrógeno líquido.

d.- Producción de dosis seminales de calidad uniforme a lo largo de todo el año:

En aquellas áreas geográficas con veranos muy calurosos, por ejemplo toda la mitad sur de España, la producción y calidad seminal de los verracos se ve mermada por el denominado estrés térmico. Así, durante el verano y principios de otoño, los verracos producen eyaculados caracterizados por un bajo número de espermatozoides y mala calidad de los mismos, lo cual redundaría en una menor producción de dosis que además tienen una peor calidad espermática y una reducida capacidad de conservación en refrigeración. Crear un banco con suficientes dosis seminales criopreservadas, elaboradas durante los meses en los que los verracos producen eyaculados con mayor cantidad y calidad seminal (por ejemplo durante el invierno y la primavera), permitiría disponer de dosis seminales con una calidad uniforme a lo largo de todo el año, dosis que podrían ser utilizadas con garantía durante los meses de verano y otoño. Por lo tanto, la utilización del semen criopreservado permitiría minimizar el problema de la estacionalidad reproductiva.

3.- Estado actual de la criopreservación espermática

La utilización del semen criopreservado en la especie porcina se remonta a los años 70, cuando se publicaron los primeros nacimientos de lechones (Polge y cols., 1970; Crabo y Einarsson, 1971; Graham y cols., 1971). Dichos resultados reflejaban que la fertilidad y prolificidad del semen criopreservado eran entre un 20-30% y 2-3 lechones más bajas que con semen fresco o refrigerado. A partir de entonces el objetivo fue mejorar los ratios de fertilidad del semen criopreservado, sin embargo los progresos fueron reducidos y recientemente se seguía constatando la misma baja fertilidad y prolificidad (revisado por Johnson y cols., 2000). Este estancamiento científico, ha sido vencido en los últimos 3-4 años gracias a que las investigaciones, hasta entonces basadas más en aspectos empíricos, se han centrado en estudiar las peculiares características que concurren en la especie porcina, tanto en lo relativo a los aspectos estructurales, bioquímicos y funcionales de los espermatozoides y su respuesta cuando son congelados y descongelados, como en las posibilidades que los espermatozoides tienen, una vez descongelados, de fecundar a los ovocitos cuando son depositados durante la inseminación en el tracto reproductivo de la cerda. El impulso científico de estos últimos años ha contribuido a mejorar la rentabilidad del semen criopreservado tanto desde una perspectiva productiva como económica.

A nivel productivo, actualmente, podemos conseguir dosis seminales a la descongelación con más del 50% de espermatozoides viables y móviles. Esta mejora sustancial de la calidad espermática post-descongelación se debe a:

(1) La constatación de la existencia de diferencias individuales en la criopreservación espermática, que parecen tener origen genético (Thurston y cols., 2002), nos indica que no todos los verracos son válidos para entrar en los programas de criopreservación espermática, siendo, por lo tanto, necesario seleccionar los reproductores donantes de semen en función de la congelabilidad de sus espermatozoides. Aproximadamente, alrededor del 30% de los verracos no deberían formar parte de los programas de criopreservación espermática (Figura 2).

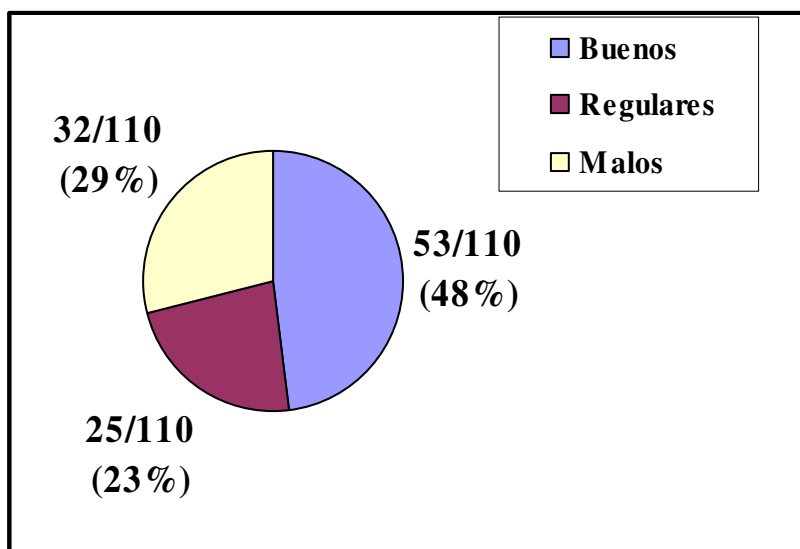


Figura 2.- Distribución de los verracos según la congelabilidad de sus espermatozoides. Los buenos tienen una motilidad post-descongelación superior al 45% y los malos inferior al 35%.

(2) La sustitución de las clásicas macropajuelas de 5 mL, como medio de envase, por los denominados flat-pack, también de 5 mL (Eriksson et al., 2001) o por las minipajuelas de 0'5 mL (Roca et al., 2003) que permiten una congelación y descongelación mucho más homogénea de las células espermáticas, lo cual repercute enormemente de manera positiva en la recuperación espermática a la descongelación.

(3) La utilización de biocongeladores programables (Figura 3) que permiten una precisa y homogénea congelación de un gran número de dosis por unidad de tiempo (Thurston et al., 2003). Con dichos biocongeladores, en cada sesión podemos congelar más de 500 dosis seminales (Figura 4), garantizando, en todas ellas, las mismas condiciones de congelabilidad.



Figura 3.- Biocongelador IceCube 1810 (Minitüb, Alemania) con capacidad para congelar más de 1000 dosis espermáticas envasadas en pajuelas de 0'5 mL.



Figura 4.- Racks cargados de pajuelas de 0'5 mL dispuestos para el proceso de congelación en la cámara de un biocongelador.

(4) La adición de compuestos con capacidad antioxidante a los diluyentes de congelación (Gadea y cols., 2004; Peña y cols., 2003 y 2004; Roca y cols., 2004 y 2005), lo cual mejora significativamente el porcentaje de espermatozoides recuperados tras la descongelación.

A nivel económico, la reducción drástica del número de espermatozoides descongelados necesarios por dosis de inseminación ha mejorado la rentabilidad del semen criopreservado. Con los sistemas tradicionalmente de IA son necesarias dosis seminales con 6000 millones de espermatozoides (revisado por Johnson y cols., 2000), es decir el doble que con semen refrigerado. Esta situación hace que la utilización del semen criopreservado en los programas de IA sea poco rentable al elaborarse pocas dosis a partir de un eyaculado. En los últimos años se han desarrollado nuevos sistemas de inseminación con el objetivo final de reducir el número de espermatozoides por dosis de inseminación sin modificar la fertilidad y prolificidad, la denominada inseminación transcervical (TCI) y la intrauterina profunda (DUI, Figura 5). Ambas, aunque en diferente grado, han demostrado ser efectivas con espermatozoides frescos o refrigerados: 1000 millones para la TCI (Watson y Behan, 2002) y 150 millones para la DUI (Martínez y cols., 2002). Si bien no nos consta que se haya utilizado la TCI con espermatozoides congelados-descongelados, si existen estudios realizados con la DUI. Roca y cols. (2003) y Bolarín y cols. (2005) inseminan mediante la DUI cerdas destetadas y en estro natural con dosis seminales de 5 mL con 1000 millones de espermatozoides congelados descongelados alcanzando tasas de fertilidad (porcentaje de cerdas inseminadas que paren) superiores al 70% y con más de 9 lechones nacidos por parto (Tabla 1). Estos resultados ponen de relieve, de manera clara, que la DUI es un procedimiento de inseminación rentable para el semen criopreservado ya que permite obtener tasas de fertilidad con tan sólo 1000 millones de espermatozoides comparables a cuando se utilizan 6000 millones mediante inseminación tradicional. Además, el número de espermatozoides por dosis de inseminación es, incluso, más reducido que el utilizado habitualmente en la inseminación tradicional con semen fresco o refrigerado (3000 millones de espermatozoides por dosis).

Estas nuevas perspectivas que ofrece la inseminación, mediante DUI, con semen criopreservado, han motivado que numerosas Empresas del sector consideren la posibilidad de introducir el semen congelado-descongelado en sus programas de IA. En este sentido, nuestro equipo de investigación, en los últimos 5 años, ha colaborado con las más importantes Empresas españolas del sector creando bancos de dosis seminales criopreservadas, bien procedentes de verracos de alto valor genético o como reserva frente a posibles contingencias sanitarias. Destacar que para crear dichos bancos, hemos desarrollado un protocolo de criopreservación que permite congelar eyaculados 24 h después de su recogida, tiempo necesario para transportar los eyaculados desde los centros de recogida hasta nuestros laboratorios.

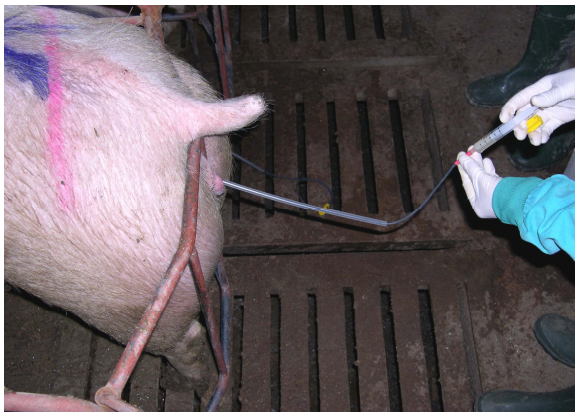


Figura 5.- Procedimiento para la realización de la inseminación intrauterina profunda.

En resumen, hoy podemos conseguir con el semen criopreservado tasas de fertilidad superiores al 70% con 9-10 lechones nacidos utilizando para ello dosis de inseminación de tan solo 1000 millones de espermatozoides. Estos resultados demuestran que el semen criopreservado puede ser rentable. De hecho, en cualquier otra especie, dichos resultados serían considerados como excelentes, incluido el vacuno de leche donde la IA con semen criopreservado es habitual (Vishwanath y Shannon, 2000). Sin embargo, todavía la fertilidad y prolificidad conseguida con el semen criopreservado en la especie porcina sigue siendo algo menor que aquella alcanza con el semen refrigerado, entre 10-15% y 1 lechón menos por camada. Aunque existen posibilidades reales de mejorar algo los resultados con semen criopreservado a tenor de las investigaciones que están en curso, creo que será muy difícil igualar los resultados de fertilidad y prolificidad que obtenemos utilizando el semen fresco o refrigerado. Resultados, los del semen fresco o refrigerado, que, por otra parte, pueden ser extraordinariamente altos (más del 85% de fertilidad con más de 11-12 lechones de media por camada), circunstancia que no se da en ninguna otra especie domestica donde se utiliza la inseminación artificial.

4.- Manejo reproductivo y estrategias de inseminación para semen criopreservado

Para alcanzar los resultados de fertilidad y prolificidad anteriormente mencionados con el semen criopreservado debemos, por un lado, extremar el manejo

reproductivo, y por otro lado, a veces incluso modificarlo, ya que algunas de las estrategias de inseminación utilizadas para semen fresco o refrigerado no son válidas para el semen criopreservado.

Respecto al manejo reproductivo, un mal o inapropiado manejo siempre repercute negativamente en la fertilidad y prolificidad, sin embargo la repercusión cuando se utiliza semen criopreservado suele ser mucho mayor. En aquellas explotaciones donde la fertilidad y prolificidad son altas con semen fresco o refrigerado, es posible obtener también excelentes resultados con semen criopreservado. Sin embargo, cuando los resultados de fertilidad y prolificidad son mediocres con semen refrigerado, bien por un mal o inapropiado manejo reproductivo o bien por malas condiciones sanitarias, los resultados con semen criopreservado suelen ser muy malos. Tal y como se demuestra en la Figura 6, las diferencias de fertilidad entre semen refrigerado y criopreservado se amplían a medida que descenden los resultados obtenidos con el semen refrigerado.

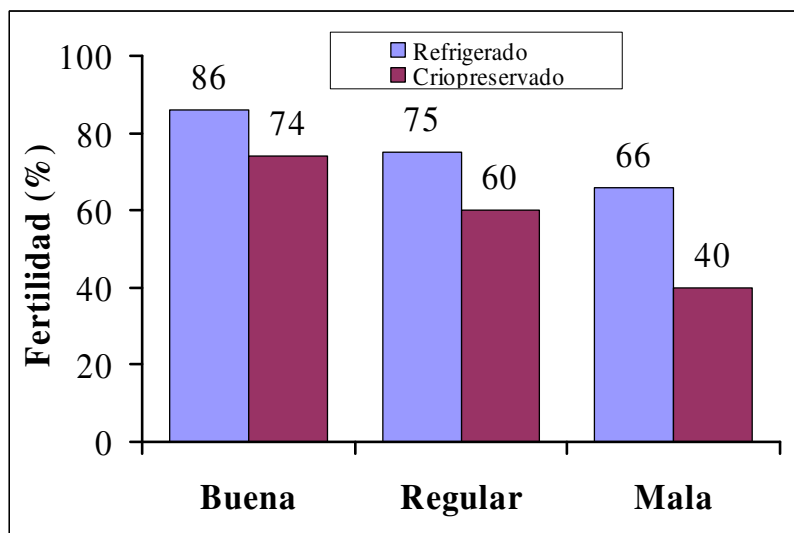


Figura 6.- Diferencias de fertilidad (porcentaje de cerdas que paren) tras inseminación con semen refrigerado o criopreservado en tres granjas con diferente fertilidad del semen refrigerado.

Con relación a las estrategias de inseminación, cuando se pretende utilizar de manera rentable el semen criopreservado, las estrategias de inseminación habituales para semen fresco o refrigerado deben cambiar. Los cambios más significativos afectan a:

(1) El procedimiento de inseminación. La deposición del semen en el cervix, como se realiza con el procedimiento tradicional, no es la más apropiada para el semen criopreservado. En ninguna especie la deposición vaginal profunda o cervical de semen criopreservado da buenos resultados de fertilidad y prolificidad, la especie porcina no es una excepción. La deposición de los espermatozoides en el interior de los cuernos uterinos, mediante la DUI por ejemplo, permite alcanzar buenos resultados con un reducido número de espermatozoides (Roca y cols., 2003).

(2) Temporalización de las inseminaciones. La clásica doble inseminación a las 0 y 24 h o a las 12 y 24 h, utilizada para semen fresco o refrigerado, no es útil para el semen criopreservado. Siguiendo dicha pauta de inseminación la fertilidad con semen criopreservado sería casi nula. La razón, la reducida vida media de los espermatozoides descongelados en el interior del aparato genital de la cerda, no más de 6 h (Waberski y cols., 1994). Conscientes de esta limitación, debemos adecuar el momento de inseminación al de ovulación.

(3) Detección del inicio del estro. El mejor procedimiento natural para intentar adecuar el momento de inseminación con el de ovulación es realizar una correcta detección del inicio del estro. El semen fresco o refrigerado, por su larga vida media funcional en el aparato genital de la cerda, entre 20 y 24 h (Waberski y cols., 1994), permite cierto relajamiento en la detección del inicio del estro. Así, en muchas granjas la detección solo se realiza una vez al día y, normalmente, no en las mejores condiciones (las mejores condiciones para la detección sería realizarla en parques de unos 15 m² con no más de 10-12 cerdas y con la presencia del verraco). Cualquier posibilidad de éxito con el semen criopreservado pasa por una correcta y precisa detección del inicio del estro y para ello, como mínimo, realizarla 2 veces al día. De esta manera podemos intentar que en la mayoría de las cerdas una de las dos inseminaciones se realice próxima al momento de ovulación. La alternativa sería la utilización de tratamientos hormonales (eCG y hCG, Roca y cols., 2003) para sincronizar el momento de ovulación y así adecuar el de inseminación.

(4) Utilizar diferentes pautas de inseminación. Cuando utilizamos semen fresco o refrigerado empleamos normalmente siempre una misma pauta de inseminación, es decir 2 inseminaciones bien a las 0 y 24 h o bien a las 12 y 24 h. Con el semen criopreservado y siempre con el objetivo de adecuar el momento de inseminación al de ovulación, deberíamos utilizar pautas diferentes en función del intervalo destete-inicio del estro (DIE) ya que la duración del estro y el momento de la ovulación varían (Steverink y cols., 1999). Con un DIE corto, 3-4 días, la duración del estro es larga y la ovulación suele ocurrir más allá de las 30-40 h del inicio del estro. Con un DIE largo, 5-6 o más días, la duración del estro es corta y la ovulación suele ser más temprana, entre 20 y 30 h del inicio del estro.

(5) Diferentes estrategias para diferentes granjas. La duración del estro y por lo tanto el momento de ovulación varían entre granjas (Steverink y cols., 1999). Por ello pautas de inseminación que pueden ir bien en una determinada granja, pueden ser nefastas para otra. Determinar cuando se produce la ovulación, utilizando para ello estudios ecográficos seriados de los ovarios (Figura 7), en cada explotación sería ideal para definir la pauta más adecuada de inseminación para cada explotación (Bolarín y cols., 2005).

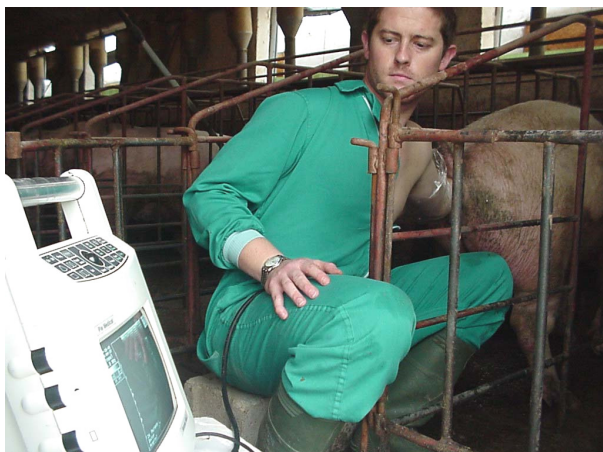


Figura 7.- Procedimiento para la realización de ecografías vía rectal en la cerda con el objetivo de evaluar el estado funcional de los ovarios.

Agradecimiento

Los resultados de nuestro grupo de investigación recogidos en la presente memoria son fruto de investigaciones financiadas por los proyectos CICYT (AGF98-0533), INIA (RZ01-019), CDTI (01-0272) e INFO (2004).

Referencias bibliográficas

Bolarín A, Carvajal G, Hernández M, Vazquez JM, Martínez EA, Roca J. Time of insemination relative to ovulation explains fertility variations of frozen-thawed spermatozoa between faros. *Reprod Fertil Develop*. 2005, 17:155-156

Crabo, B.G. y Einarsson, S. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1971, 12:125-127.

Eriksson BM, Petersson H, Rodriguez-Martinez H. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology*. 2002 Oct 1;58(6):1065-79.

Eriksson BM, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Lucas X, Rodriguez-Martinez H. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*. 2001 May 1;55(8):1593-605.

Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, Ruiz S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*. 2004 Aug;62(3-4):690-701.

Graham, E.F.; Rajamannan, A.H.J.; Schmehl, M.K.L.; Maki-Laurila, M. y Bower, R.E. Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar spermatozoa. *A.I. Digest*. 1971, 19:12-14.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*. 2000 Aug 18;62(1-3):143-72.

Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL, Day BN. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *Reproduction*. 2001 Aug;122(2):289-96.

Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*. 2004 May; 12(2):117-24.

Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci*. 2003 Sep 15;78(1-2):85-98.

Polge C, Salamon S, Wilmut I. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet Rec*. 1970 Oct 10;87(15):424-9.

Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JM, Martinez EA. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*. 2003 Jun;60(1):77-87.

Roca J, Gil MA, Hernandez M, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J Androl*. 2004 May-Jun;25(3):397-405.

Roca J, Rodriguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA. Survival and In Vitro Fertility of Boar Spermatozoa Frozen in the Presence of Superoxide Dismutase and/or Catalase. *J Androl*. 2005 Jan-Feb;26(1):15-24.

Salamon S, Guillan L, Evans G, Maxwell WMC. Fertility of ram semen after long-term frozen-storage. 13th Int Congr Anim Reprod. 1996. Sydney, vol 3 pp. P24-25 (Abstract).

Steverink DW, Soede NM, Groenland GJ, van Schie FW, Noordhuizen JP, Kemp B. Duration of estrus in relation to reproduction results in pigs on commercial farms. *J Anim Sci*. 1999 Apr;77(4):801-9.

Thurston LM, Holt WV, Watson PF. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. *Theriogenology*. 2003 Jun;60(1):101-13.

Thurston LM, Watson PF, Holt WV. Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *Cryo Letters*. 2002 Jul-Aug;23(4):255-62.

Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci*. 2000 Aug 18;62(1-3):23-53

Waberski D, Weitze KF, Gleumes T, Schwarz M, Willmen T, Petzoldt R. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology*. 1994;42:831-840.

Watson PF, Behan JR. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*. 2002, 57:1683-1693.