INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN LA ESPECIE PORCINA

I. Parrilla, C.Cuello y M.A.Gil. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia

Introducción

Actualmente, el sector de la producción ganadera está creciendo mas rápidamente que cualquier otro sector productivo y, de acuerdo con las predicciones de la FAO, en el año 2020 será el sector agrícola mas importante en términos de valor añadido (FAO, 1999). La demanda creciente de productos animales, así como una mayor exigencia en la calidad y seguridad de estos productos condicionará de forma importante los sistemas de producción ganadera obligando a una optimización y mayor rentabilización de los mismos.

En respuesta a esta demanda creciente de proteínas animales de alta calidad la productividad de las explotaciones dedicadas a la producción porcina ha aumentado de forma significativa en las pasadas décadas y sobre todo en los últimos años. Según un informe reciente de la FAO, en los 10 últimos años la producción de carne porcina se ha incrementado de 89 a 104 toneladas métricas y es previsible que esta producción llegue a las 125 toneladas métricas en los próximos años (FAO, 2009). Este aumento en la efectividad productiva de las explotaciones de ganado porcino es el resultado de la implementación de nuevas tecnologías sobre todo de aquellas relacionadas con el manejo reproductivo de los animales (Niemann y cols., 2003; Gerrits et al., 2005). En este sentido, estudios recientes señalan que la aplicación de este tipo de tecnologías jugará un importante papel en el futuro de la industria porcina, no solo para producción de alimentos sino también para la mejora en la calidad de los productos, para el incremento en la salud y bienestar de los animales y también para la reducción en el impacto medioambiental de las explotaciones.

El principal objetivo de estas técnicas reproductivas, entre las que destaca la inseminación artificial (IA), es aumentar la eficiencia reproductiva de la explotación, así como acelerar los beneficios derivados de la introducción de programas de mejora genética contribuyendo a un incremento en los rendimientos del sector productivo porcino. Además la utilización de estas técnicas permite la diseminación y conservación de recursos genéticos de gran valor (FAO 1999 y 2008; Niemann y cols., 2003).

Sin duda alguna la IA es el ejemplo mas claro de la utilidad de la aplicación práctica de métodos de manejo reproductivo en el sector productivo porcino, pudiendo ser definida hoy en día como un procedimiento industrial de amplia utilidad a nivel mundial. El gran desarrollo que ha sufrido esta práctica es debido, sin duda, a la serie de ventajas que supone su utilización tanto para la explotación porcina como para el productor.

Antecedentes de la IA en el ganado porcino

La inseminación artificial puede ser definida como el procedimiento mediante el cual es posible recolectar semen de un macho probado de alta calidad, analizarlo, diluirlo y conservarlo, para ser aplicado en el tracto genital de la hembra, en el momento adecuado, usando medios mecánicos.

La IA en la especie porcina comenzó a practicarse en Rusia en los años 30 de la mano de Ivanow (Ivanow 1907 y 1922), extendiéndose su uso en las granjas de este país en los siguientes años (Rodin y Lipatov, 1935; Milovanow, 1938). La técnica fue introducida en Europa hacia la mitad del siglo XX, gracias, en gran medida, a las experiencias realizadas por del ingles C. Polge (Polge, 1956), incrementándose su uso practico y comercial a nivel de granja durante los años 1960-1970. Durante estos años se desarrollaron dispositivos que facilitan la realización del procedimiento como es el caso de catéter en forma de espiral creado por Melrose y Cameron. Paralelamente durante estos años se produce también el desarrollo de diluyentes específicos para semen de porcino, así como de métodos adecuados para la extracción y procesamiento del semen. Finalmente, es a partir de los años 80-90 cuando el uso práctico y comercial de la IA cobra importancia a nivel de las explotaciones, gracias a que en esta década es cuando aparecen los protocolos de evaluación de calidad seminal y se realizan estudios con el objetivo de mejorar el procedimiento de IA mediante el diseño de nuevos métodos de recolección del semen y mejora de los protocolos de inseminación para su adecuación en condiciones comerciales (revisado por Johnson y cols., 2000).

Situación actual de la IA en el ganado porcino

Desde sus inicios hasta la actualidad el empleo de la IA en ganado porcino ha experimentado un gran desarrollo debido a las numerosas ventajas que presenta tanto a nivel sanitario como zootécnico, y de manejo de la explotación (ver tabla 1) .

La introducción de la IA ha permitido disminuir el número de verracos en las granjas ya que donde antes eran necesarios 40-50 verracos para cubrir 1000 hembras en monta natural, hoy en día gracias a la IA son necesarios tan sólo unos 10. Este hecho hace posible la aplicación de criterios mas estrictos a la hora de seleccionar los machos reproductores de nuestra explotación y como resultados de esta mejor selección un mayor progreso genético con una mejor calidad del producto final. Con la I.A. vamos a disminuir el riesgo de transmisión de enfermedades y podemos tener un mayor control sanitario mejorando el tratamiento individual del verraco. Otras ventajas de manejo que presenta el empleo de la I.A. en nuestra granja es que podemos disminuir el tiempo empleado en realizar las cubriciones y vamos a evitar el estrés de los animales (por movimientos de hembras, machos...). Todo ello nos va a proporcionar una disminución en los costes de producción, una mayor productividad y una producción uniforme, homogénea y de alta calidad genética

Sin embargo y a pesar de las numerosas ventajas que presenta la utilización de la IA, también existen algunos inconvenientes en su aplicación. Uno de estos inconvenientes es que se requiere un nivel de manejo más alto que en monta natural. Debido a que este procedimiento implica la

VENTAJAS ZOOTECNICAS	
1.-	Disminución del número de verraco por granja con el consecuente ahorro de espacio y costes de mantenimiento
2.-	Rápida difusión del progreso genético debido al uso de sementales de mayor valor genético
3.-	Producción y envío al matadero de lotes de animales mas homogéneos
4.-	Mejor precisión en la evaluación del valor genético de cada verraco debido al aumento en el número de concepciones por semental
5.-	Incremento en la intensidad de selección de los machos debido a que la reducción en su número permite ser mas estricto
6.-	Permite reducir en número de espermatozoides por cubrición sin comprometer la tasa reproductiva
7.-	Permite controlar la calidad espermática de los verracos y la rápida detección de machos infértiles
VENTAJAS SANITARIAS	
1.-	Reducción del riesgo de transmisión de enfermedades infectocontagiosas por vía sexual
2.-	Reducción de la entrada de animales del exterior y por tanto de la posibilidad de entrada de enfermedades
VENTAJAS DE MANEJO	
1.-	Facilita el manejo por bandas
2.-	Ahorro tiempo y trabajo ya que evita el desplazamiento de los reproductores
3.-	Elimina los problemas relacionados con la incompatibilidad de tamaño de los reproductores

Tabla 1. Relación de ventajas derivadas de la aplicación de la inseminación artificial en las explotaciones porcinas

recogida, dilución y preparación de las dosis de IA existe mayor oportunidad de que ocurran errores humanos que con la monta natural. La obtención de tasas de concepción óptimas y camadas numerosas implica la realización de la IA de forma correcta y en el momento oportuno siendo de extrema importancia una correcta detección del celo. Es importante destacar que cuando se realiza un estricto control tanto de la manipulación del semen como del manejo reproductivo de la explotación la IA puede ofrecer resultados extraordinarios comparables a los obtenidos por monta natural en cualquier explotación porcina.

En la actualidad la inseminación artificial es una técnica que ha intensificado su uso principalmente en países con alto desarrollo tecnológico. Su aplicación en Europa ha tenido un importante papel en la mejora de la producción porcina desde hace unos 35-40 años (Gerits y col., 2005) y ha sustituido casi totalmente a la monta natural en muchos países europeos como es el caso de España, Alemania, Francia o Noruega entre otros. El incremento en la utilización de este método a nivel europeo ha sido de un 85 a un 90 % en años recientes y a nivel global, en la actualidad, mas de 25 millones de inseminaciones artificiales en ganado porcino son realizadas en todo el mundo (Martínez et al., 2005; Vázquez et al., 2008). Según Johnson y colaboradores (2000) la mayoría de las I.A. son realizadas con semen refrigerado conservado entre 15-20 °C y mas de un 85% de las mismas se realiza el mismo día de la extracción del semen y la preparación de las dosis o en las 24 horas siguientes. A este gran desarrollo en la utilización de la IA contribuye sin duda el hecho de que es una herramienta de gran utilidad para la diseminación de genética de alta calidad de una forma rentable y también el hecho de que los resultados obtenidos igualan o incluso mejoran los obtenidos en sistemas tradicionales con monta natural (Turba y cols., 2007).

Selección de verracos para IA. Entrenamiento de los verracos y obtención del eyaculado. Características del eyaculado. Contrastación seminal: métodos convencionales y avanzados. Preparación de las dosis de IA.

Selección de verracos Para IA

La selección de los verracos para IA es de gran importancia, ya que el impacto de su genética en la descendencia es mucho mayor que el de una hembra. Las diferentes razas y líneas genéticas de porcino presentan aptitudes productivas diferenciadas. Existen "razas maternales", como la Yorkshire, Large White o Landrace que se emplean para mejorar la fertilidad y la capacidad de lactación de las hembras de la explotación.

Por otro lado, existen razas como la Hampshire, Duroc o Pietrain que se utilizan por su conformación para mejorar la conformación cárnica de la descendencia. En este caso, las características que se suelen tener en cuenta para seleccionar las líneas de machos son: la ganancia de peso diario, espesor de la grasa dorsal, conformación y aspecto físico. Los verracos para IA se seleccionarán en primer lugar por sus aptitudes productivas teniendo en cuenta que estén libres de enfermedades, su estado fisiológico general y sus parámetros reproductivos.

El protocolo de valoración de los verracos para IA tendrá en cuenta los siguientes parámetros:

Inspección física del verraco:

La condición corporal debe ser adecuada, para machos de 9 meses de edad el peso deber ser de unos 170 kg aproximadamente. En el caso de verracos para IA es fundamental la conformación de las pezuñas, que los aplomos sean correctos y que se descarte cualquier tipo de cojeras. El examen del aparato genital es de gran importancia. Los testículos de los machos jóvenes deberán tener como mínimo una longitud de 8 cm y un diámetro de 5 cm. Los testículos deberán ser simétricos, siendo la diferencia de sus diámetros inferior a 1 cm. La consistencia de los testículos debe ser firme y que no se muevan libremente en el escroto. Se examinarán además el pene y el prepucio para comprobar que estén libres de lesiones.

Líbido

Se valora en función del tiempo que tarda el verraco en realizar la monta en el maniquí desde que entra en la sala de recogida. Se considera que un verraco tiene una líbido excelente cuando muestra interés por el maniquí y tarda menos de 5 minutos en realizar la monta.

Comportamiento durante la colección del eyaculado:
Es importante evaluar el comportamiento sexual del verraco durante la recogida del eyaculado. Los verracos con un comportamiento óptimo son aquellos que permancen tranquilos, no intentan bajarse del maniquí antes de tiempo y tardan en eyacular más de 5 minutos.

Calidad del eyaculado:
Para la evaluación de la calidad del eyaculado se emplearán varias técnicas de contrastación seminal, ya que no existe una prueba laboratorial que valore por sí sola la calidad de un eyaculado. La valoración de la calidad seminal del verraco deberá incluir un mínimo de 6 eyaculaciones consecutivas (1/semana). En los siguientes apartados describiremos algunas de las técnicas de contrastación seminal que se pueden emplear para evaluar un eyaculado.

Los requerimientos mínimos para que un eyaculado pueda utilizarse para la preparación de dosis de IA son: Una motilidad progresiva de al menos un 60-70%, un porcentaje de formas anormales inferior al 30%, una cantidad de espermatozoides total de 30-60 x 109 según la edad y la frecuencia de utilización del verraco, y una buena capacidad de conservación (más de un 60% de motilidad progresiva y un 65% de acrosomas normales después de 48 horas de refrigeración).

Todos los verracos deberán pasar un periodo de cuarentena y aclimatación de unos 45-60 días al llegar a una nueva explotación, y empezarán su actividad reproductiva a los 8 meses de edad una vez finalizado su periodo de entrenamiento.

Entrenamiento de los verracos y obtención del eyaculado

El sistema de recogida del eyaculado de los verracos para la IA consiste en que el macho realice la monta en un potro o maniquí. La colección del eyaculados se realiza mediante es el sistema manual o de mano enguantada, ya que la presión es el principal estimulo para desencadenar la eyaculación en el verraco (Hafez, 2000). El objetivo del entrenamiento de los verracos jóvenes, es que aprendan a realizar la monta en el potro y un operario pueda colectar el eyaculado.

El entrenamiento de los verracos comienza cuando éstos alcanzan la pubertad (aproximadamente a los 6-7 meses de edad), no antes de los 6 meses ni después de los 10 meses de edad. Es recomendable que el entrenamiento lo realice la persona encargada del manejo de los verracos. El entrenamiento generalmente consta de dos o tres sesiones al día de no más de 15-20 minutos, preferiblemente a primera y última hora del día, evitando la hora anterior y posterior a la comida. Se puede comenzar el entrenamiento introduciendo un potro móvil en la verraquera o directamente en la sala de recogida. El potro emula el comportamiento de la cerda en celo ("reflejo de inmovilidad"). La altura del potro no debería ser mayor que la distancia desde el suelo a los ojos del verraco. El potro debe ser resistente, romo, forrado de cuero o un material similar, sin imperfecciones o roturas que puedan lesionar al macho durante la monta. Es importante que el suelo de la sala de recogida sea antideslizante para evitar caídas.

La monta del verraco puede estimularse impregnando el potro con orina y/o semen de otros verracos, orina de cerdas en celo o feromonas sintéticas. El verraco también se estimula viendo la monta de otros verracos o con masajes en el prepucio. El entrenamiento puede durar de uno a dos meses y lo habitual es que la primera monta se efectúe los primeros 7-15 días. Los primeros eyaculados que se obtienen durante el periodo del entrenamiento se someterán a una evaluación completa para determinar su calidad.

Se considera que la calidad seminal de un verraco joven ha sido evaluada cuando se completa el examen de 6 eyaculaciones consecutivas. Aproximadamente los verracos comenzarán a emplearse para IA a los 8 meses de edad. El verraco es un macho que expulsa grandes cantidades de espermatozoides en cada eyaculación, por lo que agota la reservas epididimarias muy rápido. Por ello se recomienda realizar una única recogida de eyaculado por día y respetar un periodo de reposo sexual de dos a tres días entre eyaculaciones.

Características del eyaculado

Normalmente los verracos alcanzan la pubertad como media a los 7 meses de edad (5-8 meses), al alcanzar un peso entre 70-120 kg, aunque no adquieren el máximo de fertilidad hasta los 12-18 meses. La pubertad se manifiesta por el desarrollo del aparato genital, el comportamiento sexual y la presencia de espermatozoides maduros. La espermatogénesis es el proceso mediante el cual una célula germinal llamada espermatogonia dará lugar a espermatozoides. Este proceso dura en el verraco aproximadamente 34 días.

El eyaculado de verraco comienza a tener unos parámetros de calidad aceptables alrededor de los 8 meses de edad (siempre que se hayan obtenido unas 6-7 eyaculaciones con anterioridad), aunque no adquieren el máximo de fertilidad hasta los 12-18 meses. La eyaculación del verraco es trifásica. El eyaculado consta de una fracción preespermática, una fracción espermática y una fracción posespermática. La fracción espermática es la que presenta mayor cantidad de espermatozoides, y es la parte del eyaculado que se recogerá para preparar las dosis de IA. Las otras dos fracciones están constituidas principalmente por plasma seminal. La fracción posespérmatica o tapioca contiene una sustancia gelatinosa producida por las glándulas de Cowper, cuya función es taponar el cuello uterino en la monta natural para evitar el reflujo del eyaculado (Hafez, 2000). Al obtener el eyaculado para IA se colocará una gasa a modo de filtro en el recipiente de recogida para eliminar la tapioca. Las características del eyaculado de verraco se representan en la tabla 2.

Evaluación de la calidad del eyaculado: contrastación seminal

La contrastación del semen en el laboratorio es fundamental para evitar problemas de fertilidad en la explotación. Aunque la contrastación seminal no sirve para predecir con exactitud la fertilidad espermática, la información que aporta junto con los exámenes clínicos y las fertilidades obtenidas en inseminaciones previas, nos permiten determinar la validez de un verraco como reproductor. Hay que tener en cuenta que a pesar de que un verraco se considere óptimo para IA existen muchos factores que pueden afectar a la calidad de su semen, por lo que la contrastación rutinaria del semen es el único método para evitar un descenso en la fertilidad como consecuencia de un descenso en la calidad del semen. Las técnicas empleadas para la contrastación seminal sufren un continuo desarrollo, con el fin de

CARACTERÍSTICA	
Volumen del eyaculado (ml)	150-200
Concentración de espermatozoides (millones/ml)	200-300
Espermatozoides totales (miles de millones)	30-60
Motilidad espermática (%)	50-80
Espermatozoides morfológicamente normales (%)	70-90
Proteínas (g/100 ml)	3'7
pH	7'3-7'8
Fructosa (mg/100 ml)	9
Sorbitol (mg/100 ml)	6-18
Ácido cítrico (mg/100 ml)	173
Inositol (mg/100 ml)	380-630
Glicerilfosforilcolina (mg/100 ml)	110-240
Ergotioneína (mg/100 ml)	17
Sodio (mg/100 ml)	587
Potasio (mg/100 ml)	197
Calcio (mg/100 ml)	6
Magnesio (mg/100 ml)	5-14
Cloro (mg/100 ml)	260-430

Tabla 2. Características seminales y componentes químicos del semen de verraco (adaptado de HAFEZ ESE. 2000)

buscar la predicción más fiable para la fertilidad. Existen una gran variedad de técnicas que se pueden emplear para determinar la calidad del eyaculado, sin embargo no todas ellas se pueden aplicar de forma rutinaria en los centros de IA, bien por su complejidad o por su coste.

Métodos convencionales de contrastación seminal

Los métodos convencionales de contrastación seminal consisten en una batería de pruebas fáciles de realizar y de coste relativamente bajo que permiten las características de un eyaculado. La contrastación rutinaria incluye un examen macroscópico para evaluar del color, volumen total, olor, pH del eyaculado y un examen microscópico que estudie la motilidad, morfología y viabilidad espermáticas (Foxcroft y cols., 2008).

La producción espermática determinada en función del volumen total del eyaculado y concentración espermática es un parámetro importante para determinar ciertas patologías seminales. Sin embargo, es muestras no patológicas, el número total de espermatozoides presentes en el eyaculado presenta una escasa correlación con la fertilidad y el tamaño de camada. Los procedimientos más utilizados para determinar la concentración espermática las cámaras de recuento celular y la espectofotometría (González-Urdiales y cols., 2006).

La motilidad espermática es una característica importante para evaluar la capacidad de los espermatozoides para moverse a través del aparato genital femenino. La motilidad es también una medida indirecta de la viabilidad espermática. El análisis subjetivo de la motilidad es uno de los más utilizados por su sencillez, consiste en colocar una gota de la muestra en un portaobjetos previamente atemperado y visualizar la muestra en el microscopio a 100 aumentos. Se valorará el porcentaje de espermatozoides móviles, así como la calidad de su movimiento en una escala de 0 a 5 (González-Urdiales y cols., 2006). Actualmente se emplean cada vez más los métodos objetivos de análisis de la motilidad asistidos por ordenador (sistemas CASA; Soler y cols., 2006). Se ha sugerido (Flowers, 1997) que el porcentaje de la motilidad es útil para estimar la capacidad fecundante de un verraco cuando su valor es inferior al 60%. Xu y cols. (1998) no encontraron correlación entre la motilidad espermática y el tamaño de camada de cerdas destetadas inseminadas con dosis entre 2 y 3 x 109 espermatozoides. Sin embargo, Tardif y cols. (1999) mostraron que existe existe una alta correlación entre la motilidad y la tasa de partos cuando se emplean dosis de IA de 0'3 x 109 espermatozoides. Estos datos muestran que quizá la elevada concentración espermática de la dosis empleadas para IA enmascara el efecto de la motilidad sobre la capacidad fecúndate de los espermatozoides.

La morfología espermática es otro parámetro interesante que generalmente se evalúa en la contrastación rutinaria. Se ha descrito que ciertas morfoanomalías espermáticas están relacionadas con casos de infertilidad (Bonet y Briz, 1991). Además, el estudio de las morfoanomalías espermáticas nos puede indicar si existe una sobreutilización de los verracos. Para la evaluación de la morfología espermática se pueden emplear tinciones y observar los frotis en campo claro o bien, evaluar las muestras espermáticas fijadas con un microscopio de contraste de fases (González-Urdiales y cols., 2006). La evaluación morfológica del acrosoma requiere la valoración de las muestras con un microscopio de contraste de fases.

La viabilidad espermática se evalúa mediante tinciones que detectan la integridad de la membrana. La contrastación rutinaria incluye generalmente tinciones vitales como la eosina-nigrosina o tripán azul (Gonzalez-Urdiales, 2006) o tinciones con fluorocromos permeables tales como el SYBR-14.

Métodos avanzados de contrastación seminal

Los parámetros seminales que se evalúan en el espermiograma clásico, tales como la motilidad, morfología y concentración espermáticas, no son suficientes para detectar pequeñas alteraciones que se producen cuando los espermatozoides se someten a tecnologías tales como la criopreservación o la separación espermática. Actualmente existen análisis de la funcionalidad espermática que permiten la detección de cambios físicos y bioquímicos muy tempranos que tienen lugar en los espermatozoides y que posteriormente darán lugar a cambios más graves en su viabilidad. Estos test funcionales incluyen el estudio de la cinemática de los espermatozoides y de subpoblaciones espermáticas con sistemas CASA, evaluación de cambios

en las membranas, determinación de daño en la cromatina, integridad del ADN y estudio de las interacciones espermatozoide-ovocito y espermatozoide-oviducto entre otros (Holt y cols., 2007; Silva y Gadela, 2006; Petrunkina y cols., 2007).

Los sistemas CASA se emplean a nivel comercial para el análisis rutinario de la motilidad, ya que determinan de manera objetiva la motilidad y la calidad del movimiento espermático (Didion, 2008). Actualmente los datos obtenidos con los sistemas CASA se emplean para diferenciar subpoblaciones espermáticas mediante un análisis de algoritmos de tipo "cluster", este nuevo sistema de análisis de la motilidad ofrece más información acerca de la relación entre motilidad espermática, calidad espermática y fertilidad. Otro de los sistemas empleados para estudiar las subpoblaciones espermáticas es el análisis de la morfometría asistido por ordenador (sistemas CASMA). Se ha demostrado que la distribución de las subpoblaciones establecidas mediante los estudios de morfometría están relacionadas con la fertilidad (Saravia y cols., 2007). Otro parámetro relacionado con la morfología espermática que ha sido objeto de estudio recientemente es el volumen celular (Petrunkina y cols., 2007) que parece guardar una estrecha relación con la funcionalidad de la membrana espermática.

La membrana citoplasmática de los espermatozoides es una de las características espermáticas más estudiadas. La integridad de la membrana espermática se evalúa mediante el empleo de tinciones con fluorocromos permeables tales como el SYBR-14 (Silva y Gadella, 2006). Aunque la evaluación de la viabilidad espermática es una técnica rutinaria para el análisis de la calidad espermática, estas tinciones no pueden detectar cambios subletales en los espermatozoides que ocurren principalmente en los espermatozoides sometidos a tecnologías reproductivas. La célula espermática puede sufrir una serie de cambios parecidos a la capacitación espermática, o envejecimiento prematuro similares al fenómeno de la apoptosis (Peña y cols., 2008). Estos cambios implican una desestabilización de la membrana espermática que puede detectarse estudiando desórdenes en los lipidos con el fluorocromo merocianina-540 (Harrison y Gadella, 2005; Gurthrie y Welch, 2005) o evaluando asimetrías en la membrana por el cambio de posición de la fosfatidil serina con el Annexin-V (Peña y cols., 2003). Los cambios tempranos en la permeabilidad de la membrana pueden monitorizarse también con el fluorocromo YO-PRO-1 (Peña et al., 2005).

La integridad de las mitocondrias y la funcionalidad están claramente relacionadas con la viabilidad y la motilidad, y es uno de los parámetros que pueden indicar daños tempranos en la integridad de los espermatozoides. Las mitocondrias se evalúan midiendo el potencial de la membrana mitocondrial interna con fluorocromos como el JC-1, Mitotracker green y mitotracker deep red (Guthrie y Welch, 2006; Bussalleu y cols., 2005; Hallap y cols., 2005). Existen otros análisis se pueden realizar para estudiar la funcionalidad espermática tales como la determinación de la concentración de calcio intracelular (Caballero y cols., 2008), estimulando la fosforilación de la tirosina proteica (Piehler y cols., 2006) o detectando la presencia de caspasas activadas (Moran y cols., 2008) y los niveles de sustancias oxígeno reactivas (Guthrie y Welch, 2006).

Los cambios en la estructura de la cromatina y la integridad del ADN se han relacionado con infertilidad en diferentes especies de mamíferos. El test de la estructura de la cromatina (SCSA), el test cometa (comet assay) y la prueba de la dispersión de la cromatina son algunas de las técnicas que se aplican actualmente para estudiar la fragmentación del ADN de los espermatozoides de verraco.

Otras de las pruebas que se pueden emplear para realizar un estudio más detallado de la capacidad fecundante de los espermatozoides son los test in vitro de unión a la zona pelúcida, las pruebas de unión al epitelio del oviducto (Petrunkina y cols., 2007; Wabersky y cols., 2005), los test de penetración in vitro con ovocitos inmaduros o las pruebas de producción in vitro de embriones (Rodriguez-Martinez, 2003). En porcino, se ha demostrado que los resultados obtenidos en el test homólogo de penetración in vitro con ovocitos inmaduros proporcionan una buena predicción sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides de verraco (Martínez y cols., 1993, 1996). Aunque otros parámetros tales como la tasa de formación de pronúcleos y el desarrollo embrionario temprano obtenidos en las pruebas de producción in vitro de embriones, podrían ser de interés para determinar la capacidad fecundante de una muestra espermática, las alta incidencia de polispermia en la especie porcina hace que resulta en una baja eficiencia de estos sistemas para producir embriones viables, hace que sea difícil el uso de estos parámetros para predecir la fertilidad del semen (Gil y cols., 2005).

Preparación de las dosis seminales. Diluyentes espermáticos

Una vez recogido y contrastado, el eyaculado se debe diluir con el fin de aumentar el volumen del mismo hasta conseguir las dosis necesarias. Esto debe de hacerse de forma que se preserven las características funcionales de las células espermáticas y manteniendo un nivel de fertilidad adecuado durante el mayor tiempo posible.

Para llevar a cabo su misión el diluyente debe:

- ✓ Aportar los nutrientes adecuados para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa).
- ✓ Mantener el pH del medio (bicarbonato, TRIS, HEPES) y la presión osmótica (sales NaCl, KCl).
- ✓ Impedir la proliferación de gérmenes (antibióticos).

En los últimos años se han realizado importantes avances en los diluyentes empleados para la conservación de los espermatozoides con el fin de mantener su capacidad fecundante intacta durante el máximo tiempo posible (Tabla 3). Actualmente, aunque no es habitual en las explotaciones, los espermatozoides pueden conservarse en determinados diluyentes por más de 5-6 días a 17ºC.

El volumen de las dosis de inseminación tradicional oscila entre 80 y 100 ml, realizándose siempre un grado de dilución inferior a 1:20 y siendo el número de espermatozoides por dosis de alrededor de 3000 millones. Tanto el semen como el diluyente deben estar a la misma temperatura en el momento de realizar la dilución. Las dosis seminales se pueden utilizar como semen fresco, cuando son utilizadas inmediatamente o a las pocas horas de efectuar la dilución o como semen refrigerado utilizando una temperatura de conservación de 15- 17ºC.

Composición (en g/l) de los diluyentes habitualmente utilizados para diluir y conservar semen de porcino en refrigeración (17ºC)								
	BTS	IVT	Kiev	Zorlesco	ZORPVA	Reading	Modena	Androhep
Glucosa	37	3	60	11'5	11'5	11'5	27'5	26
Citrato Sódico	6	24'28	3'7	11'7	11'65	11'65	6'9	8
EDTA, disódica	1'25		3'7	2'3	2'35	2'35	2'35	2'4
Bicarbonato sódico	1'25	2'4	1'2	1'25	1'75	1'75	1	1'2
Cloruro potásico	0'75	0'3						
Acetil-cisteina		0'05						
HEPES								9'5
BSA				5				2'5
TRIS				6'5	5'5	5'5	5'65	
Ácido cítrico				4'1	4'1	4'1	2'9	
Cisteina				0'1	0'7	0'7	0'05	
Trealosa						1		
PVA					1	1		

Tabla 3. Composición (en g/L) de los diluyentes habitualmente utilizados para diluir y conservar semen de porcino en refrigeración (17ºC)

Inseminación en la hembra. Detección del celo. Diagnóstico de la ovulación. Inseminación tradicional cervical

Detección del celo en la hembra

La detección del celo de las hembras a inseminar es uno de los pilares fundamentales de la I.A. debido a la estrecha relación entre el momento de la ovulación y el inicio del celo. Para la detección del celo en la cerda se pueden utilizar diversos métodos que varían en cuanto a su exactitud:

- ✓ Observación de los signos externos. Se basa en la observación del edema y de la hiperemia vulvar. La porción interna de la vulva está congestionada y enrojecida por las secreciones vaginales provocadas por los estrógenos. Además se puede observar la presencia de moco vaginal transparente por la vulva.
- ✓ Observación del comportamiento sexual. Durante el proestro la cerda se muestra nerviosa e inquieta, busca al verraco aunque no permite la monta, disminuye la ingesta de pienso, mantiene las orejas erguidas. Durante el estro la cerda busca de igual modo al verraco pero permite la monta.
- ✓ La utilización de técnicas ecográficas, principalmente aquellas que implican la introducción de la sonda por vía rectal, son una estimable ayuda para precisar el momento de la ovulación mediante la realización de ecografías seriadas de los ovarios.
- ✓ Desencadenamiento del reflejo de inmovilización. Es el método más efectivo para detectar el celo de forma correcta. Se caracteriza por la contracción de la mayoría de los músculos esqueléticos como respuesta natural para facilitar la monta. Para desencadenar este reflejo se requiere la utilización de un macho sexualmente maduro puesto que son los estímulos auditivos y olfatorios emitidos por el verraco los factores más importantes para inducir esta inmovilización durante el celo.

La detección del celo se debería realizar dos veces al día (mañana y tarde) para asegurar la detección del inicio del estro y establecer así con exactitud el momento idóneo para llevar a cabo las inseminaciones. La ovulación en la cerda ocurre cuando han pasado dos tercios de la duración del celo propiamente dicho, lo cual implica que un celo de mayor duración acarrea una ovulación más tardía. De media la ovulación se produce aproximadamente a las 40 horas después del comienzo del reflejo de inmovilidad o del pico de LH. En función del sistema de detección aplicado, la I.A. se realiza en el momento del inicio del celo y se repite a las 24 horas.

Para inseminar a la cerda se utilizan catéteres que imitan el pene del verraco para adaptarse de forma correcta al cérvix de la hembra. Existen en el mercado varios tipos de catéteres de un solo uso. En el momento de la inseminación se limpia la periferia de la vulva para evitar contaminaciones, se separan los labios vulvares y se introduce el catéter dirigiéndolo hacia el techo de la vagina hasta que quede ajustado en los pliegues cervicales. Una vez colocado el catéter, se introduce la dosis lentamente, sin presionar el envase para evitar que exista reflujo.

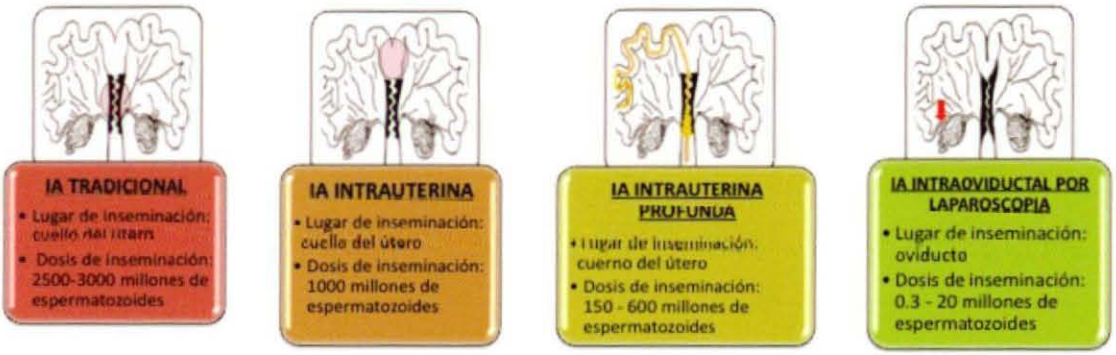

Figura 1. Lugar de deposición de los espermatozoides y dosis a utilizar en los diferentes procedimientos de inseminación aplicables en la especie porcina: espermatozoides utilizando este sistema de inseminación

Nuevos métodos de IA

Hasta el momento actual las técnicas estándar de IA porcina que implican, como se ha descrito anteriormente, la deposición intracervical de entre 2.500 y 3000 millones de espermatozoides por inseminación en un volumen de dosis de alrededor de unos 100 mililitros y aplicadas dos o tres veces durante el periodo de estro, han sido suficientes para satisfacer los requerimientos del sector productivo porcino. Sin embargo, el desarrollo de nuevas biotecnologías reproductivas aplicables a la célula espermática, como son la criopreservación o la selección y separación de espermatozoides X e Y para predeterminar el sexo de la descendencia, que sin duda pueden contribuir de forma notable a aumentar los beneficios productivos y económicos de las explotaciones, requieren el diseño de nuevas estrategias de inseminación que permitan utilizar un reducido numero de espermatozoides en cada dosis (revisado por Vázquez y cols., 2008).

La posibilidad de reducir de forma importante el número de espermatozoides para realizar una inseminación efectiva (hasta 500.000 espermatozoides por inseminación en algunos casos) permitiría rentabilizar al máximo la utilización de dosis seminales con un coste elevado (por ejemplo semen sexado, semen congelado o semen de verracos con un alto valor genético), contribuyendo sin duda al uso generalizado de estos espermatozoides y a la obtención de los numerosos beneficios que su aplicación puede representar a nivel productivo (revisado por Johnson, 2000; Martínez y cols., 2005 o Vázquez y cols., 2008).

En los últimos años se han diseñado diferentes procedimientos y estrategias destinadas a la obtención de unos parámetros reproductivos óptimos utilizando un número reducido de espermatozoides de verraco. Estos procedimientos están basados de forma general en la deposición de los espermatozoides en diferentes porciones del tracto genital de la hembra porcina en un intento de facilitar el encuentro entre el espermatozoide y el ovocito y por tanto de aumentar las posibilidades de conseguir una fecundación efectiva.

Los métodos utilizados para la inseminación con un número reducido de espermatozoides pueden ser clasificados en función del lugar donde estos se depositen. En una revisión realizada recientemente por Vázquez y cols., (2008) se describen tres procedimientos para la realización de este tipo de inseminaciones: Inseminación post-cervical o intrauterina cuando los espermatozoides se depositan en el cuerpo del útero; Inseminación intrauterina profunda consistente en la deposición de las células espermáticas en la profundidad de un cuerno uterino e inseminación intraoviductal por laparoscopia en la cual los espermatozoides son depositados directamente en el oviducto. A continuación se describen brevemente los aspectos mas relevantes de cada una de ellas (ver figura 1)

Inseminación post-cervical o intrauterina

Como se ha señalado anteriormente, este procedimiento de inseminación consiste en depositar los espermatozoides en el cuerpo del útero de la hembra porcina. El principar obstáculo para este tipo de inseminación viene determinado por la presencia de los pliegues del cuello del útero, los cuales deben ser atravesados para alcanzar el cuerpo uterino. Para la realización de este tipo de inseminación suele utilizarse un catéter de inseminación tradicional colocado de igual forma que se haría en una IA convencional y a través de este se pasa el dispositivo de inseminación intrauterina que suele ser un catéter de menor diámetro y unos 15 a 20 cm mas largo que un catéter estándar de IA y que permite atravesar toda la longitud del cervix y depositar los espermatozoides en el cuerpo del útero (ver figura 2)

Estudios realizados a nivel comercial demuestran que la aplicación de este procedimiento permite reducir la dosis de IA hasta 1000 millones de espermatozoides sin afectar a los parámetros reproductivos (Watson y Behan, 2002). El logro de unos resultados óptimos de fertilidad a nivel de granja mediante la utilización de este procedimiento implica de forma indiscutible la realización en la explotación de un buen manejo reproductivo (Vázquez y cols., 2008).

Inseminación intrauterina profunda

El objetivo de la inseminación intrauterina profunda es depositar las células espermáticas en el tercio distal del cuerno uterino, intentado acercarnos lo mas posible a la unión útero-tubárica. El diseño y desarrollo de este sistema se llevó a cabo en el laboratorio del Grupo de Investigación de Reproducción Animal de la Facultad de Veterinaria de Murcia a finales de los años 90.

Al igual que ocurría en la inseminación post-cervical,

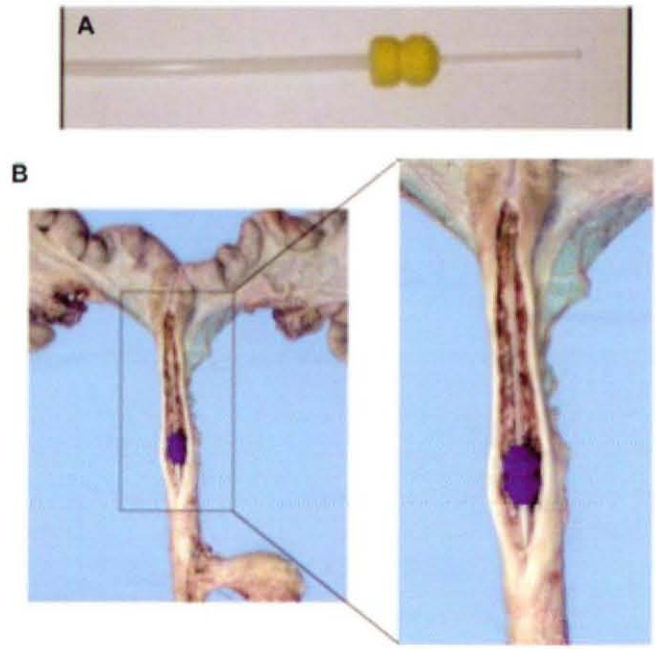

Figura 2.Inseminación post-cervical o intrauterina: A: Diferentes tipos de catéteres de inseminación intrauterina. ; B: Imagen de un útero de cerda mostrando el lugar de deposición (cuerpo del útero) de los espermatozoides utilizando este sistema de inseminación

nos encontramos en este caso con el inconveniente de atravesar los pliegues del cuello uterino, pero en este caso además contamos con un inconveniente añadido que es la extremada longitud y la disposición enrollada de la de los cuernos uterinos en la hembra porcina. Teniendo en cuenta estos aspectos se creo un dispositivo diseñado especialmente para superar estos obstáculos y permitir la deposición del semen en la profundidad del cuerno uterino (Figura 3A). El procedimiento de inseminación consiste en hacer pasar este dispositivo a través de la luz de un catéter de IA tradicional que nos sirve fijar el cuello uterino. Una vez situado el catéter de IA tradicional de la misma manera que lo haríamos en una IA estándar, el dispositivo de inseminación intrauterina es pasado a través de su luz empujando suave y a la vez firmemente para superar el canal cervical y progre sar hacia el cuerpo uterino en primer lugar y finalmente alcanzar el cuerno uterino (Martinez y cols., 2001; 2002; ver figura 3B y 3C).

Diferentes estudios demuestran que la inserción del catéter de inseminación intrauterina profunda es posible en un 90% de las cerdas, siendo necesario un tiempo de entre 3 y 4 minutos por inseminación (Vázquez y cols., 2005; Martínez y cols, 2005; Roca y cols., 2006). Es importante señalar que la utilización de este sistema no produce ningún daño o alteración del tracto reproductivo de la hembra y que estudios realizados en esta línea demuestran que los parámetros reproductivos correspondientes a IA tradicionales realizadas antes y después de la inseminación intrauterina profunda son similares, indicando que este método de inseminación no tiene ningún efecto perjudicial sobre la fertilidad de las hembras (Bolarin y cols., 2005).

La utilización de este procedimiento permite disminuir el número de espermatozoides por inseminación

Figura 3. Inseminación intrauterina profunda

Figura 3A. Catéter flexible utilizado para la inseminación intrauterina profunda (1' 80 m de longitud; diámetro externo de 4 mm, canal de trabajo de 1'80 mm)

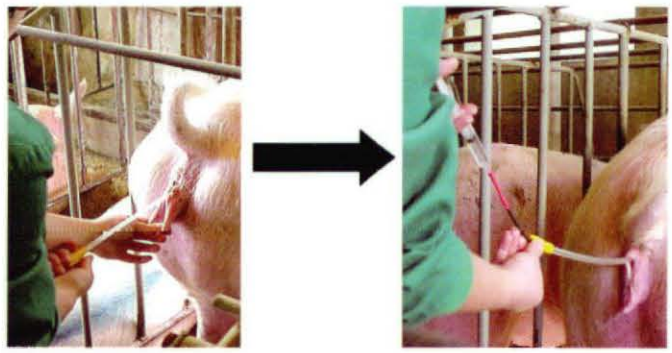

Figura 3B. Para la realización de la inseminación intrauterina profunda, una vez limpia el áreaperineal de la hembra con agua y jabón se inserto en el cerviz un catéter comercial de IA a través del cual se introdujo el catéter flexible para la inseminación profunda. Elcatéter de IA sirvió para facilitar la manipulación del catéter flexible que fue propulsadoa través del cerviz a lo largo del cuello uterino tan profundo como fue posible

Figura 3C. Situación del catéter de IA en el cuello uterino y del catéter flexible de inseminación int rauterina profunda progresando por el interior de uno de los cuernos uterinos de t racto genital de la cerda.

hasta entre 150 millones (en un volumen de 5 ml) y 600 millones (en un volumen de 20 ml), lo que representa una dosis entre 20 y 5 veces menor que la usada en una IA tradicional. Las tasas de gestación obtenidas tras la aplicación de esta inseminación a nivel de granja fueron similares a los obtenidos con IA normal (Vázquez y cols., 2001; Day y cols., 2003).

Por tanto, y en comparación con la inseminación estándar, el uso de la inseminación intrauterina profunda permite una disminución importante del número de espermatozoides a utilizar por dosis. Además este procedimiento ha sido utilizado para la inseminación con semen congelado de verraco (1000 millones de espermatozoides por dosis) obteniéndose unos óptimos resultados,

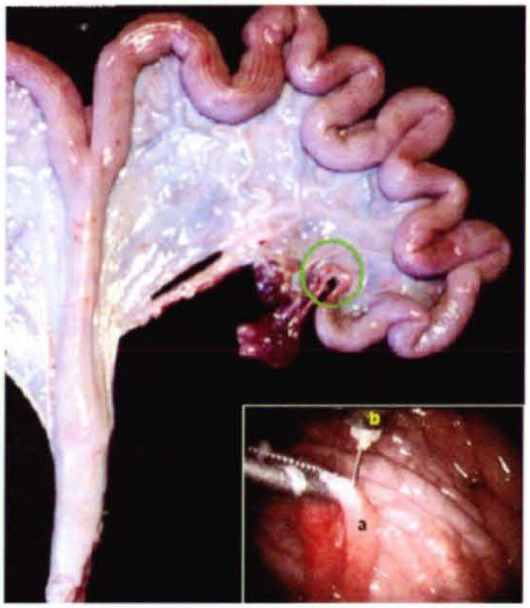

Figura 4: Inseminación intraoviductal por laparoscopia A: Imagen de un útero de hembra porcina mostrando el lugar donde se depositan los espermatozoides utilizando este sistema de inseminación ; B: Detalle de una inseminación intraoviductal por laparoscopia donde se muestra el oviducto (a) sujeto por las pinzas de laparoscopia y el dispositivo de inseminación (b).

y puede resultar también de gran utilidad para la obtención de descendencia del sexo deseado mediante la inseminación de espermatozoides separados por citometría de flujo.

Inseminación intraoviductal por laparoscopia

El desarrollo de técnicas de inseminación con un número reducido o muy reducido de células espermáticas y utilizando un volumen de inseminación pequeño se perfila hoy en día como la técnica mas eficaz para aumentar la eficiencia y optimizar los resultados de fertilidad de las inseminaciones realizadas con espermatozoides sometidos a tratamientos biotecnológicos (separación por citometría de flujo; congelación; etc).

La inseminación intraoviductal implica la deposición de los espermatozoides directamente en el oviducto y permite utilizar un número de espermatozoides por dosis realmente bajo (entre 300.000 y 20 millones de espermatozoides por dosis). Aunque en un principio era necesario realizar una cirugía mayor en los animales a inseminar, hoy en día es posible practicar esta inseminación mediante cirugía laparoscópica. Este procedimiento implica la realización de una cirugía mínimamente invasiva en las hembras y permite dejar los espermatozoides en el oviducto sin necesidad de abrir la cavidad abdominal (ver figura 4). El procedimiento implica anestesiar a los animales y la duración total del mismo es de unos 15 minutos por animal.

Aunque este método ha demostrado ser efectivo en diversos estudios(revisado por Vázquez y cols., 2008), su aplicación a nivel practico en ganado porcino se encuentra todavía en fase experimental. Sin embargo, la inseminación intraoviductal por laparoscopia se perfila como la herramienta mas útil cuando es necesario inseminar con un muy bajo número de espermatozoides. En este sentido experiencias realizadas en nuestro laboratorio demuestran que es un procedimiento eficaz para la inseminación con espermatozoides separados por citometría de flujo (García y cols., 2007).

Bibliografía

- Bolarin A, Hernandez M, Vázquez JM, Martinez EA, Roca J. 2005. Catheter insertion into uterus horn during deep intrauterine insemination does not compromise future fertility potential of sows. Reproduction in Domestic Animals. 40; 340.
- Bonet S, Briz MD. 1991. New data on aberrant spermatozoa in the ejaculate of Sus domesticus. Theriogenology; 35:725-730.
- Bussalleu E, Pinart E, Yeste M, Briz M, Sancho S, Garcia-Gil N, Badia E, Bassols J, Pruneda A, Casas I, Bonet S. 2005. Development of a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatoazoa. Microscopy Research and Technique. 68:277-283.
- Caballero I, Vazquez JM, Mayor GM, Almiñana C, Calvete JJ, Sanz L, Roca J, Martinez EA. 2008. PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. International Journal of Andrology. Doi:10.1111/j.1365-2605.2008.00887.x
- Day BN, Mathias K, Didion BA, Martínez EA, Caamano JN. 2003. Deep intrauterine insemination in sows: first field trial in USA commercial farm with newly developed device. Theriogenology. 59; 213
- Didion BA. 2008. Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. Theriogenology; 70:1374-1376.
- FAO. 1999. Livestock to 2020. The next food revolution. Delgado C, Rosegrant M, Steinfeld H, Ehui S, Courbois C. Publicado por International Food Policy Research Institute. Washington DC, 2006-1002. USA.
- FAO. 2008. Boletín de Información sobre recursos genéticos animales. Número especial correspondiente al Foro científico de la conferencia de Interlaken. Publicado en Animal Genetic Resources Information, 42, 2008.
- FAO. 2009. Database. http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor
- Flowers WL. Management of boars for efficient semen production. 1997. J Reprod Fertil Suppl; 52:67-78.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. Animal Reproduction Science. 62; 143-172.
- Gil MA, Roca J, Cremades T, Hernández M, Vázquez JM, Rodríguez-Martínez H, Martínez EA. 2005. Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates?. Theriogenology; 64:305-316.
- Gerrits RJ, Lunney JK, Johnson LA, Pursel VG, Kraeling RR, Rohrer GA, Dobrinsky JR. 2005. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. Theriogenology. 63 (2); 283-299.
- González-Urdiales R, Tejerina F, Domínguez JC, Alegre B, Ferreras A, Peláez J, Bernal S, Cárdenas S. 2006. Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, viabilidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática. En: Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino. Universidad de Girona. Red temática nacional de reproducción porcina. 2006.
- Guthrie HD, Welch GR. 2005. Effects of hypothermic liquid storage and cryopreservation on basal and induced plasma membrane phospholipid disorder and acrosome

exocytosis in boar spermatozoa. Reproduction Fertility and Development; 17: 467-477

■ Hafez ESE, Hafez B. 2000. Reproduction in farm animals. Blackwell publishers.

■ Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2005. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. Theriogenology; 63:2311-2322.

■ Harrison RAP, Gadella BM. 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. Theriogenology; 63:342-351

■ Holt WV, O'Brien J, Abaigar T. 2007. Application and interpretation of computer assissted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. Reprod Ferti Dev; 19:709-718.

■ Ivanov EI. 1907. De la fécondation artificielle chez les mammiféres. Arch. Sci. Biol. 12, 377-511.

■ Ivanov EI. 1922. On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. J. Agri. Sci. 12; 244-256.

■ Martínez E, Vazquez JM, Matas C, Roca J, Coy P, Gadea J. 1993. Evaluating of boar
spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage.
Theriogenology; 40:547-557.

■ Martinez EA, Vazquez JM, Matas C, Gadea J, Alonso MI, Roca J. 1996. Oocyte
penetration by fresh or stored diluted boar spermatozoa before and after in vitro
capacitation treatments. Biol Reprod; 55:134-140.

■ Martinez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I. 2001. Succesful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. Reproduction. 122; 289-296.

■ Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I. 2002. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility alter deep intrauterine insemination in non-sedated sows. Reproduction. 123; 163-170

■ Martinez EA, Vázquez JM, Roca J, Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL. 2005. An update on reproductive technologies with potential short-term application in pig production. Reproduction in Domestic Animals. 40; 300-309.

■ Milovanow VK. 1938. Inseminación Artificial en los animales domésticos. Seljhozig. Moscu.

■ Moran JM, Madejón L, Ortega Ferrusola C, Peña FJ. 2008 Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa. Theriogenology; 70:91-96.

■ Niemann H, Rath D, Wrenzycki C. 2003. Advances in Biotechnology: New Tools in future pig production for agriculture and biomedicine. Reproduction in Domestic Animals, 38; 82-89.

■ Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. 2003. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. Theriogenology; 60:677-689.

■ Peña FJ, Saravia F, Johannisson A, Walgren M, Rodríguez-Martínez H. 2005. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. International Journal of Andrology; 28:107-114.

■ Peña FJ, Rodriguez-Martinez H, Tapia J, Ortega-Ferrusola C, Gonzalez Fernandez L, Macias Garcia B. 2008. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: A review. Reproduction in Domestic Animal doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01211.x

■ Petrunkina AM, Waberski D, Günzel-Apęl AR, Töpfer-Petersen. 2007 Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. Reproduction; 134:3-17.

■ Piehler E, Petrunkina AM, Ekhlasi-Hundrieser M, Töpfer-Petersen E. 2006. Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation. Cytometry A; 69:1062-1070.

■ Polge C. 1956. Artificial Insemination of pigs. Veterinary Records 68. 62 -76.

■ Roca J, Vázquez JM, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Martinez EA. 2006. Challenges in pig artificial insemination. Reproduction in Domestic Animals. 41; 43-53

■ Rodin IM, Lipatov VI. 1935. Artificial Insemination in pigs. Animal Breeding, 4, 205.

■ Rodríguez-Martínez H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. Reproduction in Domestic Animals; 38:312-318.

■ Saravia F, Núñez-Martínez I, Morán JM, Soler C, Muriel A, Rodríguez-Martínez H, Peña FJ. 2007. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. Theriogenology; 68:196-203.

■ Soler C, Núñez J, Núñez M, Sancho M, Gutiérrez R. 2006. Técnicas de análisis computerizado del semen. En: Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino. Universidad de Girona. Red temática nacional de reproducción porcina.

■ Silva PF, Gadella BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. Theriogenology; 65:958-978.

Tardif S, Laforest JP, Cormier N, Bailey JL. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. Theriogenology; 52:447-459.

■ Turba ME, Fantinati P, Bernardini C, Gentilini F, Bacci ML, Forni M. 2007. Relationships between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. Animal Reproduction Science. 99 (1-2); 72-81.

■ Vázquez JM, Martínez EA, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Lucas X, y cols. 2001. Publicado en: Proceedings of the sixth International conference on pig reproduction. Pp: 132.

■ Vázquez JM, Martínez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C y cols. 2005. Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. Theriogenology. 63. 536-547

■ Vázquez Rojas JM, Roca Aleu J, Gil Corbalan MA, Parrilla Riera I, Cuello Medina C, Vázquez Rojas JL, Martínez García EA. 2006. Importancia del uso de las biologías reproductivas en los sistemas de producción porcina. En: Producir carne de cerdo en el siglo XXI, generando un nuevo orden zootécnico. Editado por Acalanthis. 2006.

■ Vázquez JM, Roca J, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Vázquez JL, Martínez EA. 2008. New developments in low-dose insemination technology. Theriogenology. 70; 1216-1224.

■ Waberski D, Magnus F, Mendoca Ferreira F, Petrunkina AM, Weitze KF, Töpfer-Petersen E. 2005. Importance of sperm-binding assay for fertility prognosis of porcine spermatozoa. Theriogenology; 63:470-484.

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

■ Xu X, Pommier S, Arbov T, Hutchings B, Sotto W, Foxcroft GR. 1998. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. J Anim Sci; 76:3079-30