

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y AGROAMBIENTAL



**EFFECTO DE LA FRACCIÓN DEL EYACULADO Y LA
TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN SOBRE LA
CALIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN PORCINO**

UNIVERSITAS
Miguel Hernández
TRABAJO FIN DE GRADO

Septiembre-2023

Autor: Paola López García

Tutores: Pedro José Llamas López

Francisco Alberto García Vázquez

RESUMEN

La elaboración de las dosis seminales en los centros de inseminación artificial porcino es un proceso clave en la cadena de producción del sector, por ello es esencial agilizar la eficiencia de trabajo en dichos centros. En los últimos años, se han incorporado sistemas de recogida de semen semi-automáticos para mejorar la eficiencia de la recogida seminal de los sementales. A diferencia de la recolección manual en la cual el operario puede seleccionar la fracción espermática a recoger, con el sistema semi-automático no se pueden seleccionar fracciones determinadas del eyaculado. Por otro lado, el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos utilizados en los diluyentes comerciales para la conservación seminal, está mermando la capacidad de conservación de las dosis seminales a la temperatura estándar empleada de 15°C, ya que a esta temperatura no se inhibe el crecimiento bacteriano. Si bien la conservación del semen a temperaturas inferiores a 15°C puede ocasionar daños estructurales en la membrana espermática, debido a la sensibilidad de los espermatozoides al choque por frío, la conservación de las dosis seminales a 5°C se considera un mecanismo de defensa frente al crecimiento bacteriano. La finalidad de este trabajo fue evaluar la calidad espermática (motilidad, viabilidad, morfología) de las dosis seminales de verraco conservadas a diferentes temperaturas (15°C y 5°C), según la fracción del eyaculado recolectada. Para ello, se obtuvieron eyaculados con diferentes fracciones: 1) FE: fracción rica espermática; 2) EC: eyaculado completo (n= 6 verracos). Tras la obtención del eyaculado, éstos se diluyeron en un diluyente comercial, y las dosis seminales se conservaron a diferentes temperaturas (15°C y a 5°C) durante 5 días. A las 24h, 72h y 120h de conservación se evaluó la calidad seminal. Los resultados mostraron que no hubieron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la calidad espermática entre las fracciones recolectadas (FE y EC) y la temperatura de conservación (15°C y 5°C) de las dosis seminales en ninguno de los periodos evaluados. En conclusión, las dosis seminales preparadas con diferentes fracciones del eyaculado permiten una óptima conservación de las mismas tanto a una temperatura de 5°C como a 15°C, según los parámetros analizados.

Palabras clave: calidad seminal, conservación seminal, plasma seminal, temperaturas, verraco.

ABSTRACT

The preparation of seminal doses in swine artificial insemination center is a key process during the sector's production chain. For this reason it is essential to improve efficiency of work in these centers. In recent years, to improve efficiency has been created the incorporation of semi-automatic semen collection system. The difference between the traditional method of manual collection is that the semi-automatic semen collection system do not allow to select fractions of the ejaculate. On the other hand, the conservation capacity of seminal doses at the standard temperature of 15°C is diminishing because of the increase of the bacterial resistance to antibiotics used in commercial extenders for sperm conservation. The sperm conservation with temperatures below 15°C, can induce structural damage to the sperm membrane due to the sensitivity of sperm to cold shock. Then, the conservation of the seminal doses at 5°C it is considered a defense mechanism against bacterial growth. The objective of this work was to evaluate the sperm quality (motility, viability, morphology) of the boar seminal doses stored at different temperatures (15°C and 5°C), according to the fraction of ejaculate collected. For this, two different fractions of the ejaculate were obtained: 1) FE: sperm rich fraction; 2) EC: complete ejaculate (n= 6 boar). After extraction, they were diluted in a commercial extender, and the seminal doses were conserved at different temperatures (15°C and 5°C) for 5 days. The sperm quality was evaluated at 24h, 72h and 120h of seminal doses stored. The results showed that the sperm quality was statistically similar ($p > 0.05$) independently of the fraction collected (FE y EC) and the storage temperature (15°C y 5°C) of the seminal doses. In conclusion, seminal doses prepared with different fractions of ejaculate allowed their storage at 15°C or 5°C obtaining optimal results in sperm quality.

Keywords: boar, temperatures, seminal plasma, sperm conservation, sperm quality.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL VERRACO	8
1.1.1. TESTÍCULOS	8
1.1.2. EPIDÍDIMO	8
1.1.3. CONDUCTOS DEFERENTES.....	9
1.1.4. GLÁNDULAS SEXUALES ACCESORIAS	9
1.2. ESPERMATOZOIDE PORCINO	9
1.2.1. MORFOANOMALÍAS DEL ESPERMATOZOIDE PORCINO.....	10
1.3. EYACULADO DE PORCINO	11
1.3.1. RECOLECCIÓN DEL EYACULADO	12
1.3.2. CONSERVACIÓN SEMINAL	13
1.3.3. CONTAMINACIÓN SEMINAL	13
1.4. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN PORCINO.....	14
1.4.1. TÉCNICAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	14
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	16
3.1. ANIMALES	16
3.2. RECOLECCIÓN DE LOS EYACULADOS	16
3.3. PREPARACIÓN DE LAS DOSIS SEMINALES	18
3.4. EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD DEL SEMEN	18
3.5. EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DEL SEMEN	19
3.6. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL SEMEN (INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA).....	19
3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSIÓN	25

6. CONCLUSIONES	26
7. BIBLIOGRAFÍA	27
8. AGRADECIMIENTOS	34



1. INTRODUCCIÓN

La Unión Europea es la mayor productora de carne de cerdo del mundo, ocupando España la primera posición con un 23,9% de la producción (MAPA, 2022). Entre los principales exportadores de carne de cerdo se encuentra en primer lugar la Unión Europea constituyendo el 48% del total de las exportaciones. En España, el sector porcino es muy importante para la economía del país, siendo el primer país mayor exportador de porcino de la Unión Europea (MAPA, 2022).

La implementación de biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial (IA) ha permitido la mejora en la eficiencia de la producción porcina (Bortolozzo et al., 2015). La IA en esta especie ha ido evolucionando en los últimos tiempos (García-Vázquez et al., 2019) permitiendo grandes avances en relación a la sanidad y la producción (Cuéllar, 2020). Actualmente, el 90% de las inseminaciones se realizan mediante I.A., utilizando dosis seminales refrigeradas entre 15-17°C durante 3-5 días de caducidad (Condoy, 2017), pero la conservación de las dosis almacenadas a dicha temperatura permite la contaminación bacteriana, que puede afectar a la calidad y longevidad del semen, por lo que los diluyentes comerciales actuales contienen antibióticos (Morrell et al., 2014).

La técnica elegida por los centros de IA para la recolección de los eyaculados es un método manual conocido como el “método de la mano enguantada” (Hancock & Hovell, 1959) aunque en los últimos años se han incorporado sistemas de recogida de semen semi-automáticos, los cuales ofrecen varias ventajas frente al método manual como la estandarización entre operarios, aumento de la productividad (Lellbach et al., 2008).

Una vez recolectado el eyaculado, el semen se diluye para finalmente obtener las dosis seminales para su posterior refrigeración (15-17°C). Los espermatozoides contenidos en estas dosis seminales pueden verse afectados durante la refrigeración por varios factores como: el tipo de diluyente utilizado, la temperatura de conservación de las dosis seminales, el tiempo de conservación desde que se produce la dosis hasta la IA de la cerda y la calidad del propio semen (Pallás, 2017).

El espermatozoide porcino es muy sensible al choque térmico debido a la baja cantidad de colesterol y alta cantidad de ácidos grasos insaturados en la membrana del espermatozoide (Flores et al., 2007), por ello las dosis son conservadas entre 15-17°C (Paulenz et al., 2000). Los diluyentes se utilizan con el fin de alargar la vida útil de los

espermatozoides y proporcionar los nutrientes necesarios para protegerlos contra el choque térmico, controlar el pH y la presión osmótica del medio y evitar el crecimiento bacteriano por una posible contaminación del semen con la adición de antibióticos (Rugeles et al., 2013). Pero, el uso de antibióticos ha provocado el aumento de bacterias resistentes, lo que dificulta la lucha contra agentes infecciosos (Schulze et al., 2020). Actualmente, existen investigaciones con el objetivo de reducir o eliminar los antibióticos presentes en las dosis seminales. Estas investigaciones derivan del Reglamento (UE) 2016/429 y el Reglamento (UE) 2019/6 que establecen el uso indiscriminado de antibióticos, las resistencias antimicrobianas y la necesidad de reducir su uso.

Por todo ello, se están desarrollando nuevos estudios que permitan reducir o eliminar el uso de antibióticos que junto con un buen manejo del semen de verraco proporcionaría a las dosis seminales la seguridad para ser usadas en la IA porcina (Condoy, 2017) con una alta eficiencia de fertilidad.

1.1. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL VERRACO

1.1.1. TESTÍCULOS

Los testículos se localizan en el exterior del cuerpo, dentro de una bolsa denominada escroto. Esta zona es muy sensible a la temperatura debido a su posición, se encuentran a temperaturas entre 3°C y 4°C por debajo de la corporal (Stone, 1981).

Su función principal es producir espermatozoides y hormonas. Los testículos están formados por túbulos seminíferos donde se producen los espermatozoides, este proceso es conocido como espermatogénesis (revisado por Willenburg et al., 2017). Durante la espermatogénesis, los espermatozoides salen de los túbulos seminíferos y entran en la red testicular para dirigirse al epidídimo.

1.1.2. EPIDÍDIMO

El epidídimo es una estructura localizada a lo largo del testículo. Tiene varias funciones: la maduración de los espermatozoides, para que adquieran su capacidad fecundante, y el almacenamiento de estos (Rodríguez-Martínez et al., 2008). La maduración de los espermatozoides se produce en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y su almacenamiento se produce en la cola del epidídimo (Tittarelli et al., 2006).

1.1.3. CONDUCTOS DEFERENTES

Son unas estructuras en forma de tubo, formados por fibras musculares lisas que conectan el epidídimo con la uretra. Su función es impulsar los espermatozoides en la eyaculación (Rodríguez-Martínez et al., 2008).

1.1.4. GLÁNDULAS SEXUALES ACCESORIAS

Las glándulas sexuales accesorias producen la mayor parte del plasma seminal, un fluido corporal de composición compleja y heterogénea en el que van inmersos los espermatozoides ejerciendo un efecto sobre estos y también sobre el tracto genital de la hembra en la monta o IA. Las glándulas sexuales accesorias son: la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbo-uretrales (Rodríguez-Martínez et al., 2008).

1.2. ESPERMATOZOIDE PORCINO

El espermatozoide es una célula cuya función es fecundar el ovocito, su funcionalidad es influenciada por su morfología. Esta célula está dividida en dos partes principalmente: la cabeza y la cola. La cola se divide en cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal (Williams, 2013). La pieza intermedia termina en el anillo de Jensen que da lugar al inicio de la pieza principal, esta porción es la parte más larga de la cola (Figura 1).

La cabeza está constituida por un núcleo, tiene forma ovalada y su función es penetrar en el ovocito y depositar su carga genética. El núcleo está compuesto, en la parte exterior, por el acrosoma, y en la parte interior, por la membrana posnuclear (Williams, 2013). La capacidad fecundante del espermatozoide depende principalmente de la integridad de estas membranas (Schulze et al., 2015). El cuello es la porción del espermatozoide que une la cabeza con la cola. Es una estructura corta y estrecha compuesta por un centriolo y fibras gruesas periféricas (Williams, 2013).

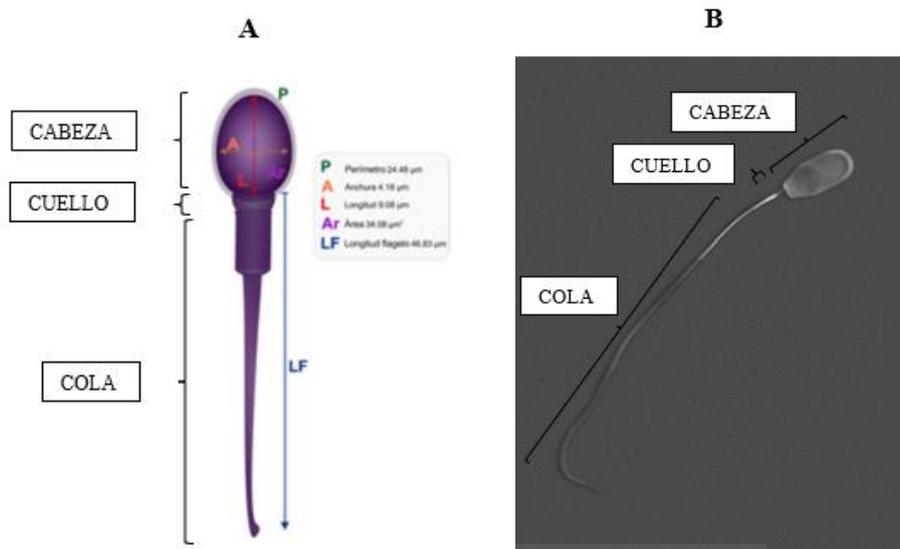


Figura 1. Estructura del espermatozoide porcino. En la figura A se observa una imagen representativa de un espermatozoide con las principales partes (cabeza, cuello y cola), en la figura B queda representado un espermatozoide observado bajo el microscopio de contraste de fases, en el que se muestran las principales partes (cabeza, cuello y cola). Fuente: García-Vázquez et al., 2015.

1.2.1. MORFOANOMALÍAS DEL ESPERMATOZOIDE PORCINO

Los espermatozoides con morfología anormal pueden tener defectos en cualquier parte de su cuerpo, lo que puede afectar a su capacidad fecundante. Se pueden encontrar alteraciones de diversa tipología que se han resumido en la Figura 2:

Miguel Hernández

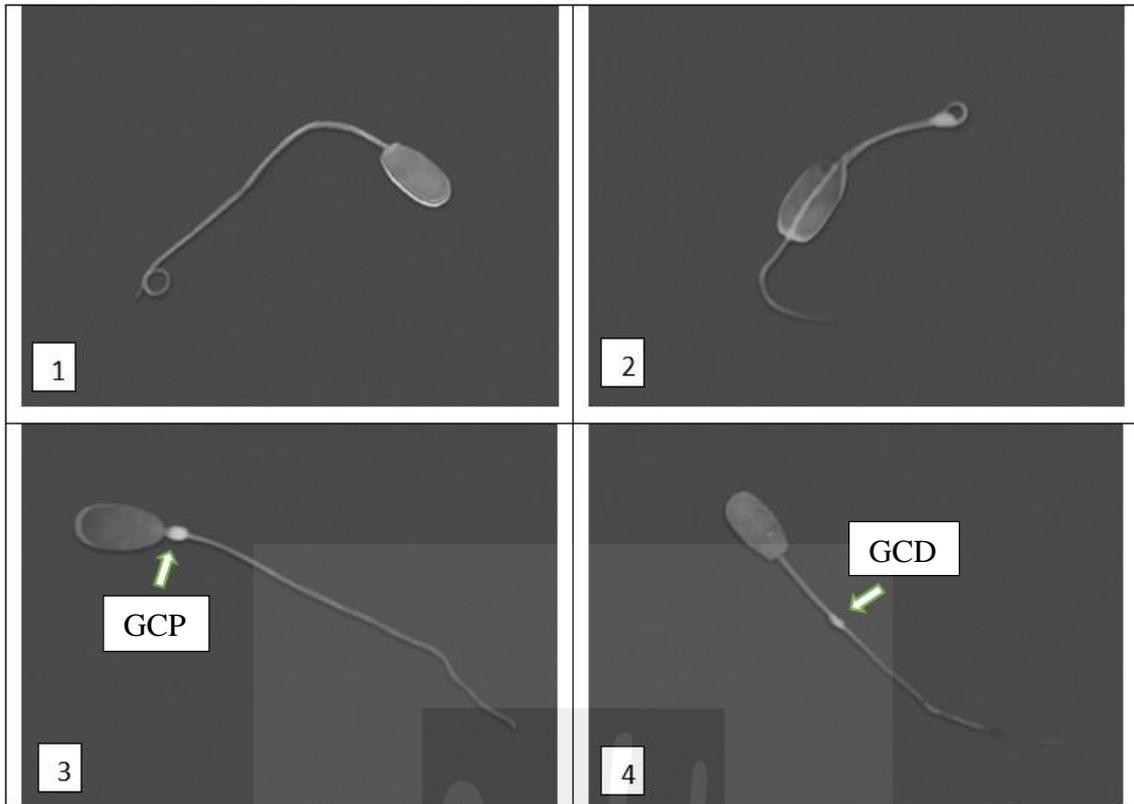


Figura 2. Anormalidades en la cola (1-4). En 1: cola en ovillo, 2: cola en látigo, 3: gota citoplasmática proximal (GCP), 4: gota citoplasmática distal (GCD). Fuente: Elaboración propia.

1.3. EYACULADO DE PORCINO

El verraco tiene una eyaculación en fracciones que se diferencian en color, volumen y composición. A continuación, se describen las principales características de cada una de estas fracciones:

1) Fracción pre-espermática:

Está constituida principalmente por las secreciones de la próstata y vesículas seminales. Es de color claro y se caracteriza por ser pobre en espermatozoides, su función es limpiar el conducto por el que pasarán posteriormente los espermatozoides para limpiarlo de orina y restos celulares. Esta fracción se descarta durante la recolección del eyaculado, con el fin de evitar recoger fracción con posible carga bacteriana (Rodríguez-Martínez et al., 2009).

2) Fracción espermática:

Tiene un aspecto lechoso y es la fracción más importante ya que está constituida por una alta concentración de espermatozoides con secreción de plasma seminal de la próstata y de la cola del epidídimo. Representa entre el 30 y 40% del eyaculado total (Rodríguez-Martínez et al., 2009). Contiene alrededor del 80-90% de los espermatozoides de una eyaculación (Dominiek et al., 2011).

3) Fracción post-espermática:

Presenta una baja concentración de espermatozoides. Está compuesta principalmente por plasma seminal que proviene de las vesículas seminales. Tiene un color blanquecino, pero es algo más transparente que la fracción rica. Esta fracción termina con la secreción de las glándulas bulbouretrales que son las encargadas de secretar el gel o tapioca (Rodríguez-Martínez et al., 2009).

1.3.1. RECOLECCIÓN DEL EYACULADO

Tradicionalmente, el “método de la mano enguantada” (Hancock & Hovell, 1959) se ha utilizado durante décadas para recolectar la fracción espermática del eyaculado de verraco y descartar la fracción post-espermática, siendo la principal técnica elegida por los centros de IA (García-Vázquez et al., 2020). En los últimos años, se han desarrollado equipos semi-automáticos para la recolección de semen, considerándose un método rutinario en algunas ciudades de América del Norte (Aneas et al., 2008). Este método semi-automático consiste en una vagina artificial que sostiene el pene durante la recolección mediante aire a presión. Este método es más rápido, obteniéndose un mayor número de eyaculados por hora, y más eficiente (Lellbach et al., 2008) que el método manual, pero la fracción post-espermática no se puede descartar, de modo que recoge el eyaculado completo (Alkim et al., 2014). Actualmente, no hay un consenso sobre la inclusión de la fracción post-espermática en la preparación de las dosis seminales porque hay que señalar que la presencia o ausencia de plasma seminal (PS) en las diferentes fracciones del eyaculado puede afectar a la calidad y la conservación del semen (Barranco et al., 2020; Dziekońska et al., 2017). La composición del PS, especialmente su contenido en proteínas, puede variar en función de la fracción recolectada (Alkmin et al., 2014; Barranco et al., 2015; Caballero et al., 2008). Por esta razón, faltan estudios que presenten los efectos comparativos entre la fracción espermática y el eyaculado completo.

1.3.2. CONSERVACIÓN SEMINAL

Las dosis seminales de verraco se conservan en refrigeración o en congelación, si bien esta última está limitada por la sensibilidad de los espermatozoides al choque térmico por frío, que provoca alteraciones en las membranas espermáticas (Ochoa et al., 2008). Al rededor del 99% de las IA en cerdas se realizan con semen refrigerado a 15°C, ya que diversos estudios han demostrado que la conservación del semen a esta temperatura no produce daños en la membrana de los espermatozoides. Por el contrario, la conservación de las dosis seminales a 15°C permite el crecimiento bacteriano, debido a la resistencia de las bacterias a los antibióticos presentes en los diluyentes comerciales (Waberski et al., 2019).

Recientemente se propuso la conservación de las dosis seminales a 5°C como alternativa a la conservación habitual de 15°C. Esta alternativa presenta el inconveniente de la sensibilidad de los espermatozoides al choque térmico por frío, que puede producir daños en la membrana plasmática de los espermatozoides, y como consecuencia se produce una reducción en la viabilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Leeuw et al., 1990; Ochoa et al., 2008). Los daños inducidos por frío están determinados por la composición lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides (Leeuw et al., 1990; Parques et al., 1992; Erma et al., 1993). Durante los primeros estudios sobre la conservación del semen a 5°C, no se mostró como una alternativa factible debido a sus efectos negativos sobre la calidad espermática. A pesar de ello, estudios recientes demuestran que el almacenamiento de las dosis seminales a 5°C no afecta a la calidad seminal (Waberski et al., 2019; Jäkel et al., 2021).

1.3.3. CONTAMINACIÓN SEMINAL

La contaminación bacteriana puede estar presente en el propio animal (testículos, glándulas sexuales accesorias, prepucio y aparato urinario) o darse durante la recogida del semen o preparación de las dosis seminales (Decuadro-Hansen, 2000). El operario que realiza la extracción y el equipo utilizado durante la misma juegan un papel importante en este proceso. Además, la manipulación del eyaculado, el uso de material no esterilizado correctamente y su dilución pueden exponer la muestra a la contaminación bacteriana.

La presencia de bacterias en las dosis seminales está relacionada con una reducción de la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, la aglutinación de los mismos o la reacción precoz del acrosoma, y todo esto lleva consigo a una reducción de la fertilidad, una posible infección bacteriana en el tracto reproductivo de la hembra e incluso en los casos más extremos, podría ocasionar una muerte embrionaria o fetal (Morrell et al., 2014).

1.4. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN PORCINO

Los centros de IA en porcino se implantaron en el siglo XX. Con el uso de la IA se han conseguido mejoras en la fertilidad, en la genética, en la producción y la eficiencia laboral (Knox, 2016).

Algunas de las ventajas que proporciona la IA son incrementar la velocidad del desarrollo genético (Sumransap et al., 2007), permitiendo la utilización de machos de alto valor genético, por lo que se consigue inseminar a varias hembras con el eyaculado de un solo macho, permitiendo de esta manera, una reducción del número de verracos en las granjas ahorrando espacio y costes de mantenimiento de dichos animales (Roca et al., 2016). Como ventajas sanitarias se encuentran la disminución del riesgo de transmisión de enfermedades por vía sexual y evita la entrada de animales en granjas portadores de enfermedades del exterior (Knox, 2016). Como ventajas en el manejo se encuentran el ahorro de tiempo al no tener que desplazar a los reproductores, permite el uso de animales con distinto peso, se reduce el estrés que sufren los animales durante la monta natural y permite la formación de lotes más homogéneos.

A pesar de las ventajas que supone el uso de la IA, también existen algunos inconvenientes como: la necesidad del entrenamiento del personal, un manejo cuidadoso de los animales y una adecuada detección del celo, con el fin de inseminar a la cerda en el momento óptimo (González, 2018).

1.4.1. TÉCNICAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Para conseguir una correcta inseminación hay que tener en cuenta varios parámetros: el sitio de deposición del semen en el aparato reproductor de la hembra, la detección del celo y el momento idóneo de inseminación. Actualmente, existen varias técnicas de IA que se describen a continuación:

- IA cervical:

Esta técnica consiste en la deposición del semen en el cérvix de la cerda. Se utilizan dosis de 75-100 ml conteniendo alrededor de 2.5×10^9 de espermatozoides por dosis (Knox, 2015). La utilización de este tipo de IA conlleva a la eliminación del 70% del volumen y el 25% de los espermatozoides de la dosis debido al reflujo (Hernández-Caravaca et al., 2012). Actualmente, esta técnica de IA es usada para inseminar cerdas nulíparas.

- IA post-cervical:

Consiste en la deposición de la dosis de semen en el cuerpo uterino. Permite la reducción del número de espermatozoides por dosis, sin afectar al rendimiento reproductivo, de esta forma se puede conseguir un mayor número de dosis de inseminación producidas por verraco (García-Vázquez et al., 2015). En este tipo de IA hay una disminución del reflujo. Se utilizan dosis que contienen alrededor de 0,5-1,5 mil millones de espermatozoides por dosis y en un volumen de 30-60 ml (Suárez-Usbeck et al., 2023). Esta técnica se utiliza para inseminar cerdas primíparas y múltiparas, y en algunos casos cerdas nulíparas.

- IA intrauterina profunda:

La dosis de semen se deposita en la profundidad del cuerno uterino, depositando los espermatozoides en el cuerno uterino en el momento de la ovulación (Vázquez et al., 2005). En este tipo de IA se puede usar una reducción de 20-60 veces el número de espermatozoides por dosis respecto a la IA convencional (Martínez et al., 2001). Esta técnica se realiza mediante la utilización de un catéter flexible, para poder introducir la dosis hasta uno de los cuernos uterinos. Debido a la complejidad de este método, no es utilizado en las granjas de producción.

Para cada una de las formas de IA se utilizan diferentes tipos de catéteres, que varían en longitud y diámetro.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Considerando la tendencia actual en la recolección de los eyaculados de verraco, las diferentes repercusiones en la calidad del semen dependen de la fracción recogida (Fracción rica frente al Eyaculado Completo). Las distintas fracciones del eyaculado de verraco difieren en la composición, que puede afectar a la calidad espermática durante la

preparación de las dosis seminales y la conservación de las mismas. Por otro lado, considerando el aumento de la contaminación bacteriana presente en las dosis seminales refrigeradas a 15°C debido a la resistencia de las bacterias a los antibióticos, existe la posibilidad de disminuir la contaminación bacteriana presente en las dosis seminales mediante la refrigeración de las dosis a 5°C.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad de las dosis seminales de verraco con diferentes fracciones del eyaculado conservadas durante 5 días, con un diluyente comercial en presencia de antibióticos, evaluando los efectos sobre la motilidad y la funcionalidad espermática en las dosis seminales conservadas a 15°C y a 5°C.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES

Se utilizaron 6 verracos de la raza francesa Duroc Axiom, de un año de edad, aproximadamente. Estos animales se encuentran en el centro de IA Spermatica Reproduccion S.L. (Lorca, Murcia).

Durante la realización del estudio, los verracos estaban alojados en cuadras individuales de 6 m² constituidas por rejillas de hormigón, y barrotes verticales para poder ver al resto de verracos. En estas instalaciones se controló la humedad (60%), la temperatura (24°C), y el fotoperiodo (16h de luz y 8h de oscuridad). Los animales fueron alimentados con un pienso para cerdos constituido principalmente por cebada, maíz y trigo, y agua *ad libitum*.

3.2. RECOLECCIÓN DE LOS EYACULADOS

La recolección seminal de los verracos se realizó mediante el método manual de la mano enguantada (Hancock y Howell, 1959). Esta técnica se realiza con machos entrenados para montar un maniquí, el cual consiste en una construcción sólida, sin bordes que puedan causarle alguna herida al verraco, situada en una sala de recogida de semen con un suelo no resbaladizo. Para la realización de este método, se utilizaron los siguientes materiales: un termo de recolección (Import-Vet[®], Barcelona, España) con un vaso desechable y un filtro, precalentado a 40°C para evitar el *shock* térmico de los espermatozoides. El filtro (Import-Vet[®], Barcelona, España) es una membrana de celulosa que se coloca en la parte superior del vaso para filtrar la fracción de gel o tapioca. También se utilizaron guantes de látex sin polvo.

En la técnica utilizada, el recolector se tiene que poner doble guante. Primero, cuando el verraco ya está montado en el potro de extracción, se limpia el prepucio con un papel y se masajea la zona prepucial cuidadosamente para estimular al animal. Después, se quita un guante para realizar la recolección con el segundo guante y así evitar cualquier contaminación con la zona prepucial. Finalmente, estando el verraco excitado, el recolector pone la mano en contacto con el pene del animal, bloqueando la espiral con los dedos, y lo mantiene presionado horizontalmente (Figura 3).



Figura 3. Extracción seminal por el método de la mano enguantada. Fuente: Elaboración propia.

En cada extracción se recolectaron diferentes fracciones del eyaculado: la fracción espermática (FE), rica en espermatozoides (Rodríguez-Martínez et al., 2009), y el eyaculado completo (EC), formado por la fracción espermática y la fracción post-espermática. Tras la recolección del semen, el filtro donde se almacena la fracción de gel o tapioca es desechado y el vaso con el eyaculado es llevado al laboratorio para su posterior análisis. El criterio aplicado para utilizar el semen recolectado era que tuviera un 70% de espermatozoides móviles progresivos y un 75% de espermatozoides con morfología normal.

3.3. PREPARACIÓN DE LAS DOSIS SEMINALES

Una vez recolectado el eyaculado, se evaluó la concentración de espermatozoides con el MetroSperm (Import-Vet®, Barcelona, España) y, posteriormente, se añadió un diluyente (270-340 mOsm/kg; pH: 6.7-7.4; Aprocell Plus, IMV Technologies, Francia) a 32°C para obtener una concentración similar en cada muestra.

Las dosis seminales de cada verraco se envasaron en envases de plástico (Import-Vet®, Barcelona, España) (Figura 4), en un volumen final de 50 ml con una concentración de $39.8 \pm 3.7 \times 10^6$ espermatozoides/ml. Inmediatamente después del envasado, se guardaron en una sala con temperaturas entre 20-22°C hasta su estabilización y, posteriormente se refrigeraron a 15°C y 5°C.

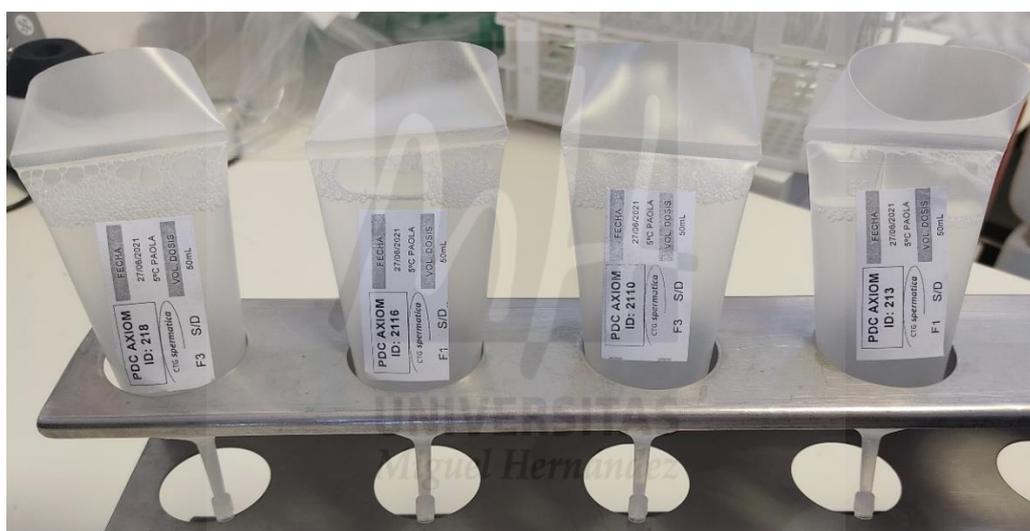


Figura 4. Envasado de las dosis seminales. Fuente: Elaboración propia.

3.4. EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD DEL SEMEN

El sistema de análisis computarizado CASA (Microptic S.L, Barcelona, España) se utilizó para evaluar la motilidad espermática. Este sistema consta de una cámara de alta resolución, un escáner de imágenes y un ordenador con un programa especializado para analizar los datos obtenidos (Valverde, 2021).

El sistema CASA está conectado a un microscopio de contraste de fases con el objetivo 10x (Nikon Eclipse E200, Import-Vet®, Barcelona, España). Las muestras se evaluaron en un portaobjetos desechable conocido como Cámara Goldcyto, (Microptic S.L,

Barcelona, España) utilizando 25 µl/muestra. Durante el análisis se grabaron entre 3 y 5 campos en los que había al menos 1000 espermatozoides en total. El sistema CASA capta 25 imágenes/segundo e incluye partículas con un área entre 10 y 80 mm².

Se distinguían las trayectorias de los espermatozoides en función de la siguiente clasificación: espermatozoide estático (<10 mm/s), lento (10-25 mm/s), intermedio (>25-50 mm/s) y rápido (>50 mm/s). Se analizaban los siguientes parámetros: motilidad progresiva (%) y motilidad total (%), incluyendo los espermatozoides lentos (%), espermatozoides intermedios (%) y espermatozoides rápidos (%).

3.5. EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DEL SEMEN

Los espermatozoides fueron previamente inmovilizados, utilizando para ello una solución fijadora a base de formaldehído. Para la preparación de esta solución, se utilizó un medio de conservación seminal y se añadió un 1% de formaldehído. Después, en tubos *Eppendorf*, se completó 1 ml de esta solución fijadora, y se añadió 0,5 ml de eyaculado.

De esta solución se tomaron 10 µl de la muestra y se colocaron en un portaobjetos y, posteriormente, se cubrió con un cubreobjetos. La morfología se evaluó con el objetivo 40x del microscopio (N-180 M binocular microscope, Import-Vet[®], Barcelona, España).

Las distintas formas de espermatozoides que se visualizaron se clasificaron en: espermatozoide normal, gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal, defectos en la cabeza del espermatozoide, cola en látigo y cola en ovillo.

3.6. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL SEMEN (INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA)

La viabilidad espermática se evaluó mediante la tinción de eosina-nigrosina. La solución de la tinción de eosina-nigrosina se preparó con los siguientes ingredientes: nigrosina hidrosoluble (Merck[®], Darmstadt, Germany), eosina amarilla (Merck[®], Darmstadt, Germany), citrato trisódico (Sigma-Aldrich[®], Madrid, Spain). Se diluyó en agua un 3,98% de citrato trisódico y se ajustó el pH a 6,9. Posteriormente, se mezcló eosina amarilla (2,5 g) y nigrosina (5 g) en 100 ml de solución de citrato y se filtró. Para la evaluación de la solución, se añadieron 10 ml de la muestra en igual proporción. Inmediatamente, se usó un microscopio de contraste de fases (objetivo 40x; Nikon[®]

Model YS100, Tokyo, Japan) para realizar la evaluación, contando al menos 200 espermatozoides por muestra.

Se tomó una gota de tinción y una gota de semen, de igual volumen, se mezcló y se colocó en un portaobjetos donde se realizó una extensión. Se contaron 100 espermatozoides/muestra, de campos elegidos al azar, con el objetivo 40x del microscopio, y se clasificaron en función de la integridad de la membrana plasmática. Los espermatozoides que estaban muertos presentaron una coloración rosada (figura 5), y los espermatozoides que estaban vivos no absorbieron el colorante, por lo que se veían incoloros (Campbell et al, 2009).

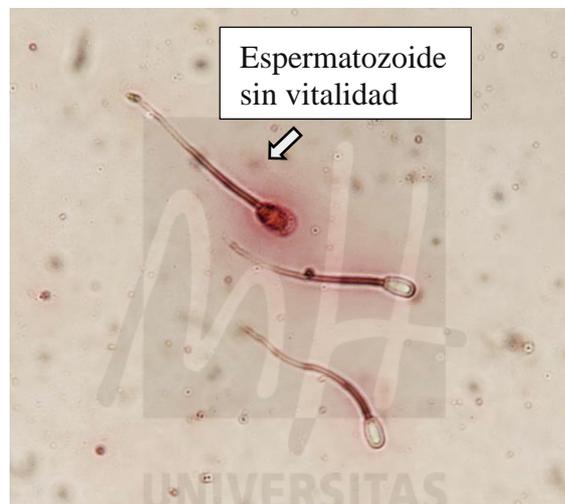


Figura 5. Espermatozoide sin vitalidad teñido de color rosa mediante tinción eosina-nigrosina. Fuente: Elaboración propia.

3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para probar el efecto de la fracción (FE y EC) sobre la calidad espermática de las dosis seminales según días de conservación (1, 3 y 5 días) y temperatura (5°C y 15°C), se estudiaron 2 eyaculados separados de seis verracos utilizados en el estudio (Tabla 1). La calidad espermática se evaluó a través de la motilidad, morfología y viabilidad.

Tabla 1. Grupos experimentales obtenidos de cada verraco. Se indica la fracción del eyaculado recolectada (FE o EC).

	FE	EC
Verraco 1	1-FE	1-EC
Verraco 2	2-FE	2-EC
Verraco 3	3-FE	3-EC
Verraco 4	4-FE	4-EC
Verraco 5	5-FE	5-EC
Verraco 6	6-FE	6-EC

FE= fracción espermática; EC= eyaculado completo.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron usando el programa estadístico IBM SPSS 24 (SPSS, Chicago, IL, USA) y el software de análisis estadístico (SAS, University Edition 2016). La normalidad se comprobó con el test Saphiro-Wilk. Los datos del experimento se analizaron por ANOVA con medidas repetidas (PROC MIXED). El modelo incluía los grupos experimentales, el tiempo de conservación de las dosis seminales (1, 3 y 5 días) y sus interacciones como efecto principal. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

La evaluación de la motilidad, viabilidad y morfología se realizó en dosis seminales formadas por distintas fracciones del eyaculado (EC y FE), conservadas a 15°C y 5°C. La motilidad total (figura 6) no se vio afectada por las distintas fracciones recogidas (EC y FE) y las temperaturas de conservación de las dosis seminales a 15°C y 5°C. Se observó que la motilidad progresiva (figura 7) y no progresiva (figura 8) no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las distintas fracciones recolectadas (EC y FE) y las temperaturas de conservación a 15°C y 5°C, encontrándose un porcentaje de motilidad no progresiva bajo durante los 5 días de conservación. El porcentaje de espermatozoides con motilidad media (figura 10), y lenta (figura 11) se encontró en un nivel bajo durante los 5 días de conservación a 15°C y 5°C, independientemente de la fracción (EC y FE), por consiguiente, se observó un porcentaje de motilidad rápida (figura 9) alto durante el

período completo de conservación, sin mostrar diferencias significativas ($p>0.05$) entre las fracciones del eyaculado recolectadas (EC y FE) y las temperaturas de conservación de las dosis seminales a 15°C y 5°C. Tampoco se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en la morfología normal (figura 12) y la viabilidad (figura 13), obteniéndose resultados similares entre las distintas fracciones del eyaculado recolectadas (EC y FE) y las temperaturas de conservación a 15°C y 5°C, lo que indica que la conservación a 5°C podría ser una alternativa para conservar las dosis seminales de verraco, sin verse afectada la calidad espermática.

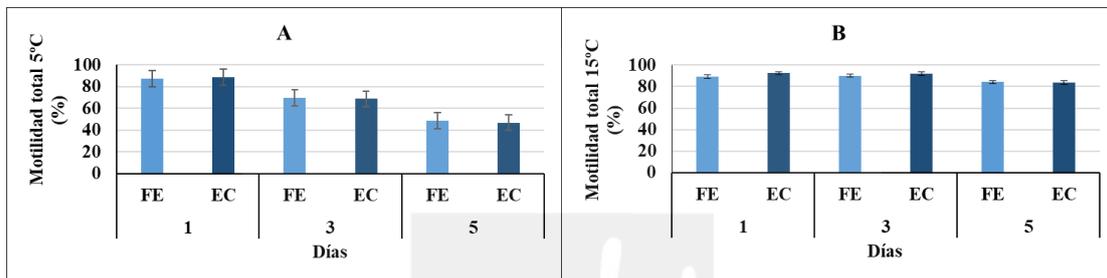


Figura 6. Efecto de diferentes fracciones de eyaculado y días de conservación en la motilidad total de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. Los resultados se expresan como Media \pm SEM. Diferentes figuras (A, B) representan la conservación de las dosis seminales a 5°C y a 15°C, respectivamente.

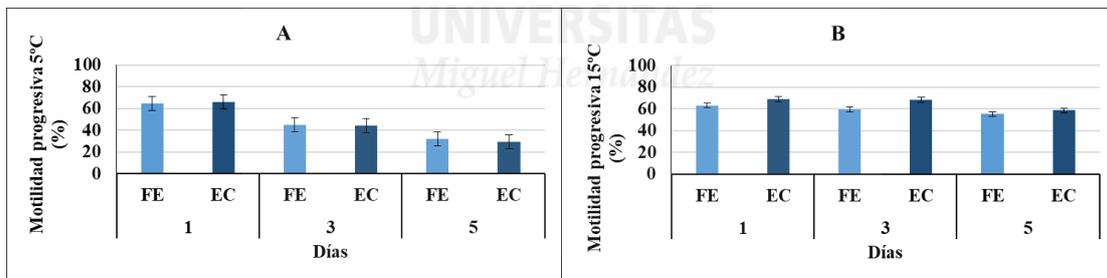


Figura 7. Efecto de diferentes fracciones de eyaculado y días de conservación en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva en dosis seminales de verraco. Los resultados se expresan como Media \pm SEM. Diferentes figuras (A, B) representan la conservación de las dosis seminales a 5°C y a 15°C, respectivamente.

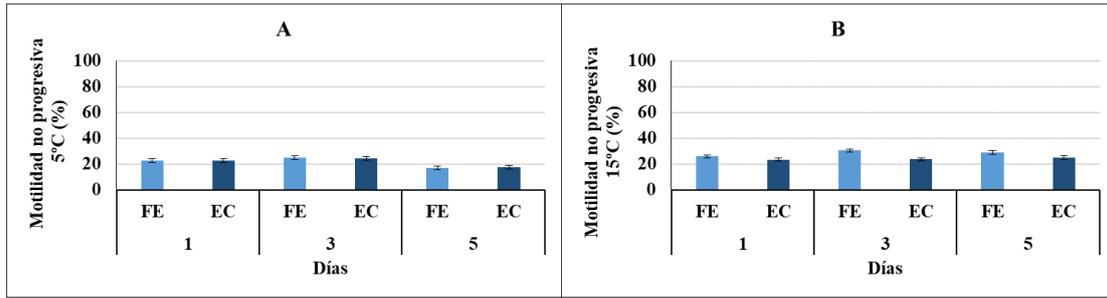


Figura 8. Efecto de diferentes fracciones de eyaculado y días de conservación en el porcentaje de espermatozoides con motilidad no progresiva en dosis seminales de verraco. Los resultados se expresan como Media \pm SEM. Diferentes figuras (A, B) representan la conservación de las dosis seminales a 5°C y a 15°C, respectivamente.

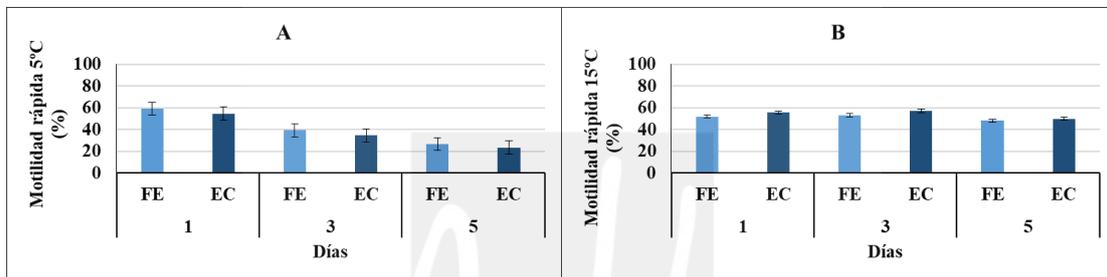


Figura 9. Efecto de diferentes fracciones de eyaculado y días de conservación en el porcentaje de espermatozoides con motilidad rápida en dosis seminales de verraco. Los resultados se expresan como Media \pm SEM. Diferentes figuras (A, B) representan la conservación de las dosis seminales a 5°C y a 15°C, respectivamente.

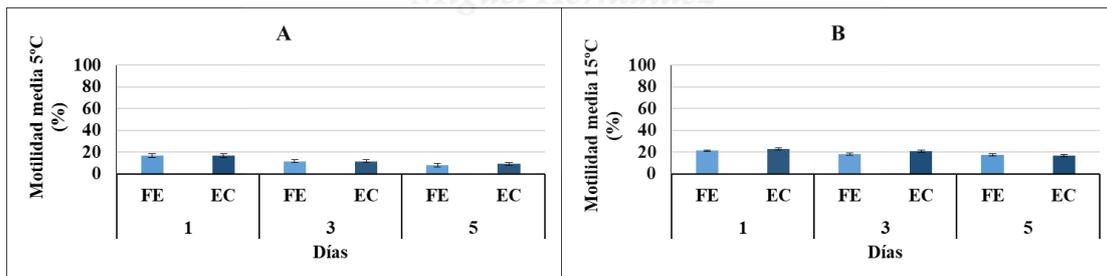


Figura 10. Efecto de diferentes fracciones de eyaculado y días de conservación en el porcentaje de espermatozoides con motilidad media en dosis seminales de verraco. Los resultados se expresan como Media \pm SEM. Diferentes figuras (A, B) representan la conservación de las dosis seminales a 5°C y a 15°C, respectivamente.

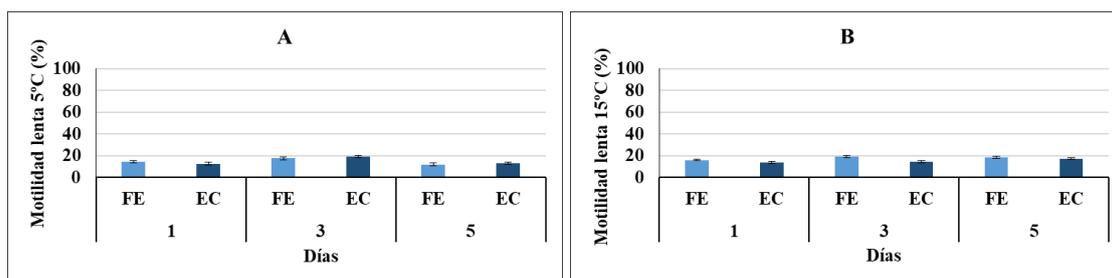


Figura 11. Efecto de diferentes fracciones de eyaculado y días de conservación en el porcentaje de espermatozoides con motilidad lenta en dosis seminales de verraco. Los resultados se expresan como Media \pm SEM. Diferentes figuras (A, B) representan la conservación de las dosis seminales a 5°C y a 15°C, respectivamente.

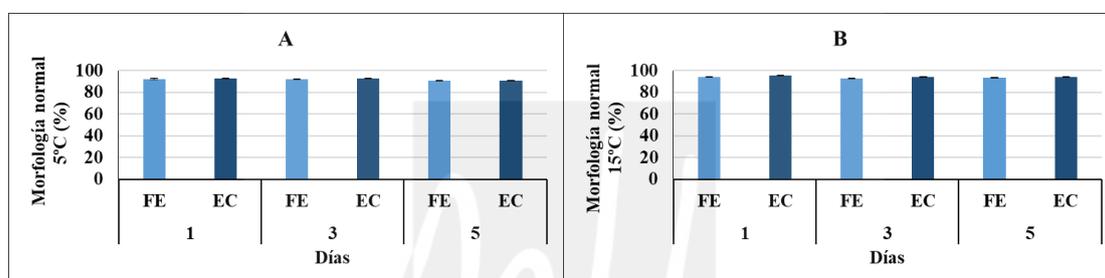


Figura 12. Efecto de diferentes fracciones de eyaculado y días de conservación en la morfología normal de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. Los resultados se expresan como Media \pm SEM. Diferentes figuras (A, B) representan la conservación de las dosis seminales a 5°C y a 15°C, respectivamente.

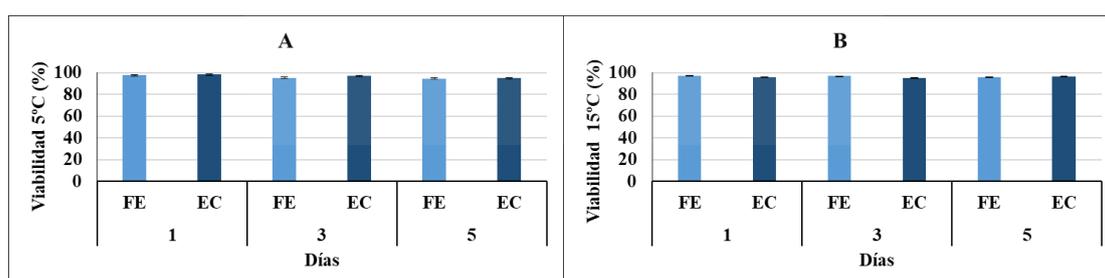


Figura 13. Efecto de diferentes fracciones de eyaculado y días de conservación en la viabilidad de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. Los resultados se expresan como Media \pm SEM. Diferentes figuras (A, B) representan la conservación de las dosis seminales a 5°C y a 15°C, respectivamente.

5. DISCUSIÓN

La IA es un pilar fundamental en la industria porcina. En Europa, alrededor del 90% de las hembras son cubiertas mediante esta técnica (Johnson et al., 2000). Los verracos son esenciales en la producción porcina debido al papel que realizan en la IA. La optimización de la producción de dosis seminales está directamente relacionada con el procesado del semen (Schulze et al., 2019), siendo un continuo desafío para la industria porcina mejorar la metodología de obtención, manipulación y conservación del semen. De acuerdo con el presente estudio, la fracción del eyaculado recogida (EC y FE) para la preparación de las dosis seminales no afecta significativamente a la calidad del semen y la composición del plasma seminal diferente entre los grupos experimentales no ha conllevado una diferencia entre los mismos pudiéndose conservar bajo nuestras condiciones experimentales en ambas temperaturas de 5°C y 15°C.

El eyaculado de verraco es sensible a la dilución durante la preparación de las dosis seminales (López Rodríguez et al., 2017), sin embargo, todavía se desconoce el impacto de este factor cuando se usan diferentes fracciones de eyaculado. En términos generales, las distintas fracciones del eyaculado utilizadas en este estudio presentaron unos resultados óptimos después de 5 días de conservación.

La motilidad no se vio afectada significativamente por ninguna de las fracciones recogidas (EC y FE). Sin embargo, otros estudios han demostrado el uso favorable de la fracción espermática sobre la fracción post-espermática (Dziekońska et al., 2017; Rodríguez-Martínez et al., 2009). Esta discrepancia puede estar relacionada con la diferencia encontrada entre la composición del plasma seminal (PS) y las razas de cerdos (Žura Žaja et al., 2016). En varios estudios, se ha demostrado que las proteínas del PS afectan a la función de los espermatozoides (Caballero et al., 2008, Rodríguez-Martínez et al., 2011). Estas proteínas se encargan de proteger a los espermatozoides durante la eyaculación del verraco, por consiguiente, se obtiene una mejor preservación de la estabilidad de la membrana celular de los espermatozoides cuanto mayor concentración de proteínas presente el eyaculado (Strzeżek, 2002). Los fosfolípidos de la membrana plasmática se reducen cuando la temperatura desciende a 5°C, causando una separación de la fase lipídica y provocando cambios irreversibles en la membrana de las proteínas (Yeste, 2017). La desestabilización de la membrana plasmática afecta a la viabilidad de

los espermatozoides y reduce su fertilidad (Buhr et al., 1989). Por otra parte, la motilidad del semen se ve afectada por las proteínas de los espermatozoides de las distintas razas de cerdos (Xu et al., 2021). Así mismo, el semen de la raza Duroc puede presentar estas características en la calidad y conservación del semen, por lo que puede ser beneficioso estudiar los efectos de las distintas fracciones recolectadas sobre la conservación y la calidad del semen de las diferentes razas de cerdos. Además, estudios realizados previamente en esta materia (Dziekońska et al., 2017; Rodríguez- Martínez et al., 2009) no analizaron las fracciones acumulativas como en este estudio, y podría existir una interacción beneficiosa entre estas fracciones en el eyaculado completo.

La conservación hipotérmica del semen de verraco podría considerarse un método para reducir el uso de antibióticos en el diluyente utilizado para elaborar las dosis seminales (Waberski et al., 2019; Paschoal et al., 2020; Jäkel et al., 2021). Uno de los desafíos de este método es el *shock* térmico al que se exponen los espermatozoides, donde se puede ver afectada la funcionalidad de estos. En otros estudios, se ha demostrado que las fracciones lipoproteicas de yema de huevo añadidas en los diluyentes, refuerzan la estabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides (Dziekońska et al., 2009), actuando como protección contra el daño inducido por el *shock* térmico durante la conservación a 5°C de las dosis seminales.

Teniendo en cuenta el alto impacto de las condiciones en granja, el manejo de la inseminación y otros factores no relacionados con el semen (Jäkel et al., 2021), sería interesante realizar pruebas de inseminación con dosis seminales almacenadas a 5°C en diferentes granjas. Los presentes resultados muestran que el almacenamiento del semen a 5°C proporciona una alternativa aplicable al almacenamiento a 15°C, con el fin de prevenir o minimizar los problemas de resistencia bacteriana.

6. CONCLUSIONES

- La calidad seminal no se vio afectada por las distintas fracciones del eyaculado (EC y FE) y las temperaturas de conservación de las dosis seminales a 15°C y 5°C.
- La calidad del semen presentó unos resultados óptimos durante la conservación de las dosis seminales a distintas temperaturas, formadas tanto por la fracción EC como FE.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alkmin, D. v., Pérez-Patiño, C., Barranco, I., Parrilla, I., Vázquez, J. M., Martínez, E. A., Rodríguez-Martínez, H., & Roca, J. (2014). Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07>
- Aneas, S. B., Gary, B. G., & Bouvier, B. P. (2008). Collectis® automated boar collection technology. *Theriogenology*, 70(8). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.011>
- Barranco, I., Padilla, L., Martínez, C. A., Álvarez-Rodríguez, M., Parrilla, I., Lucas, X., Ferreira-Días, G., Yeste, M., Rodríguez-Martínez, H., & Roca, J. (2020). Seminal Plasma Modulates mi RNA Expression by Sow Genital Tract Lining Explants. *Biomolecules*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/biom10060933>
- Barranco, I., Tvarijonaviciute, A., Pérez-Patiño, C., Parrilla, I., Ceron, J. J., Martínez, E. A., Rodríguez-Martínez, H., & Roca, J. (2015). High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep18538>
- Benítez-González, E., Chamba-Ocho A, H., Sánchez-Sánchez, E., Luzón-Cevallos, F., Sánchez-Carrillo, J. (2018). Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem. *Abanico veterinario*, 8(1). <https://doi.org/10.21929/abavet2018.81.6>
- Blank, M. H., Ruivo, L. P., Novaes, G. A., Lemos, E. C., Losano, J. D. A., Siqueira, A. F. P., Pereira, R. J. G. (2021). Assessing different liquid-storage temperatures for rooster spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 223. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106845>
- Bortolozzo, F.P., Menegat, M.B., Mellagi, A.P.G., Bernardi, M.L., Wentz, I. (2015). New Artificial Insemination Technologies for Swine.

Reproduction in Domestic Animals, 50, 80-84.
<https://doi.org/10.1111/rda.12544>

Broekhuijse, M. L. W. J., Gaustad, A. H., Bolarin Guillén, A., & Knol, E. F. (2015). Efficient Boar Semen Production and Genetic Contribution: The Impact of Low Dose Artificial Insemination on Fertility. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 50, 103–109.
<https://doi.org/10.1111/rda.12558>

Buhr MM, Canvin AT, Bailey JL. (1989). Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. *Gamete Res*, 23:441-449.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1120230409>

Caballero, I., Vázquez, J. M., García, E. M., Parrilla, I., Roca, J., Calvete, J. J., Sanz, L., Martínez, E. A. (2008). Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.013>

Campbell, R. C., Dott, H. M., & Glover, T. D. (1956). Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *The Journal of Agricultural Science*, 48(1). <https://doi.org/10.1017/S002185960003029X>

Dziekońska, A., Fraser, L., Strzeżek, J. (2009). Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18(4), 638–649.

Dziekońska, A., Świąder, K., Koziorowska-Gilun, M., Mietelska, K., Zasiadczyk, Ł., & Kordan, W. (2017). Effect of boar ejaculate fraction, extender type and time of storage on quality of spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 20(1). <https://doi.org/10.1515/pjvs-2017-0011>

Egbunike, G. N. (1981). Testis Characteristics of Pubertal Large White Boars Reared in a Humid Tropical Environment. *Andrologia*, 13(4), 284-290.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1981.tb00050.x>

Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchordoguy, T. J., Overstreet, J. W., Crowe, J. H. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. *Journal of*

Experimental Zoology, 265(4), 432-437.
<https://doi.org/10.1002/jez.1402650413>

Eva Tvrdá, E., Bučko, O., Rojková, K., Ďuračka, M., Kunová, S., Kováč, J., Benko, F., Kačániov, M. (2021). The Efficiency of Selected Extenders against Bacterial Contamination of Boar Semen in a Swine Breeding Facility in Western Slovakia. *Animals*, 11(11).
<https://doi.org/10.3390/ani11113320>

García-Vázquez, F. A., Hernández-Caravaca, I., Matás, C., Soriano-Úbeda, C., Abril-Sánchez, S., & Izquierdo-Rico, M. J. (2015). Morphological study of boar sperm during their passage through the female genital tract. *Original Article-Journal of Reproduction and Development*, 61(5).

García-Vázquez, F. A., Luongo, C., Garrappa, G., & Rodríguez Tobón, E. (2020). Reproductive Biotechnologies Applied to Artificial Insemination in Swine. In *Biotechnologies Applied to Animal Reproduction* (1st Edition, 1-41).

García-Vázquez, F. A., Mellagi, A. P. G., Ulguim, R. R., Hernández-Caravaca, I., Llamas-López, P. J., Bortolozzo, F. P. (2019). Post-cervical artificial insemination in porcine: The technique that came to stay. *Theriogenology*, 129, 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.004>

Guthrie, H. D., Welch, G. R. (2005). Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*, 63(2), 396-410. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.020>

Hancock, J., & Hovell, G. (1959). The collection of boar semen. *Veterinary Record*, 71(664), 665.

Hensel, B., UlrikeJakop, U., Scheinpflug, K., FilipSchröter, F., Sandmann, M., Mühlendorfer, K., Schulze, M. (2021). Low temperature preservation: Influence of putative bioactive microalgae and hop extracts on sperm quality and bacterial load in porcine semen. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 19.

Hernández-Caravaca, I., Izquierdo-Rico, M. J., Matás, C., Carvajal, J. A., Vieira, L., Abril, D., Soriano-Úbeda, C., & García-Vázquez, F. A. (2012). Reproductive performance and backflow study in cervical and post-

- cervical artificial insemination in sows. *Animal Reproduction Science*, 136(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.007>
- Jäkel, H., Scheinpflug, K., Kristin, M., Gianluppi, R., Lucca, M., Mellagi, A., Bortolozzo, F., Waberski, D. (2021). In vitro performance and in vivo fertility of antibiotic-free preserved boar semen stored at 5 °C. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00530-6>
- Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 143-172. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3)
- Knox, R. V. (2015). Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, 85(1), 83-93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.009>
- Knox, R.V. (2016). Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, 85(1), 83-93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.009>
- Lamberson, W. R., Safranski, T. J. (2000). A model for economic comparison of swine insemination programs. *Theriogenology*, 54(5), 799-807. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00391-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00391-5)
- Leeuw, F., Hsiao-Ching, C., Colenbrander, B., Verkleij, A. J. (1190). Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, 27(2), 171-183. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90009-S](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90009-S)
- Lellbach, C., Leiding, C., Rath, D., & Staehr, B. (2008). Effects of automated collection methods on semen quality and economic efficiency of boar semen production. *Theriogenology*, 70(8). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.048>
- Luongo, C., Garrappa, G., Llamas-López, P. J., Rodríguez-Tobón, E., López-Úbeda, R., Abril-Sánchez, S., García-Vázquez, F. A. (2020). Effect of boar seminal dose type (cervical compared with post-cervical insemination) on cooling curve, sperm quality and storage time. *Animal Reproduction Science*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106236>

- Mae, D., Rodriguez, A. L., Rijsselaere, T., Vyt, P., Soom, V. A. (2011). Artificial Insemination in Pigs. *Artificial Insemination in Farm Animals*. DOI: 10.5772/16592 <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100359>
- Martínez, E.A., Vázquez, J.M., Roca, J., Lucas, X., Gil, M.A., Vázquez, J.L. (2001). Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *Reprod Suppl*, 58, 301-311. PMID: 11980198.
- Morrell, J.M., Wallgren, M. (2011). Control of bacterial contamination in boar semen doses. *Science and Technology Against Microbial Pathogens*, 303-308. https://doi.org/10.1142/9789814354868_0059
- Ochoa, G., & Ortega, R. (2008). Evaluación in vitro e in vivo de semen porcino conservado en diluyentes de larga duración. *Revista Computarizada de Producción Porcina*, 15, 298-306.
- Parques, J. E., Linchar, D. V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29(2), 255-266. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90024-V](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90024-V)
- Paschoal, A. F., Luther, A. M., Jäkel, H., Scheinpflug, K., Mühldorfer, K., P. Bortolozzo, F., & Waberski, D. (2020). Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5° C. *PLoS One*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234339>
- Perez-Patiño, C., Barranco, I., Parrilla, I., Valero, M. L., Martinez, E. A., Rodriguez-Martinez, H., Roca, J. (2016). Characterization of the porcine seminal plasma proteome comparing ejaculate portions. *Journal of Proteomics*, 142, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.026>
- Pezo, F., Romero, F., Zambrano, F., Sánchez, R. S. (2018). Preservation of boar semen: An update. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3), 423-434. <https://doi.org/10.1111/rda.13389>
- Roca, J., I. Parrilla, I., Bolarin, A., Martinez, E. A., Rodriguez-Martinez, H. (2016). Will AI in pigs become more efficient? *Theriogenology*, 86(1), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.026>
- Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Roca, J., Peña, F. J. (2008). Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during

- freezing. *Theriogenology*, 70(8),1242-1250.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.007>
- Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Saravia, F., Wallgren, M., Johannisson, A., Sanz, L., Peña, F. J., Martínez, E. A., Roca, J., Vázquez, J. M., & Calvete, J. J. (2009). The physiological roles of the boar ejaculate. *Control of Pig Reproduction VIII*, 1–21.
- Schulze, M., Henning, H., Rüdiger, K., Wallner, U., Waberski, D. (2013). Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. *Theriogenology*, 80(9), 990-998. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.026>
- Schulze, M., Ammon, C., Rüdiger, K., Jung, M., Grobbel, M. (2015). Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology*, 83(3), 430-437. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.004>
- Schulze, M., Ammon, C., Schaefes, J., Luther, A. M., Waberski, D. (2017). Impact of different dilution techniques on boar sperm quality and sperm distribution of the extended ejaculate. *Animal Reproduction Science*, 182, 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.05.013>
- Schulze, M., Jakop, U., Jung, M., Cabezón, F. (2019). Influences on thermo-resistance of boar spermatozoa. *Theriogenology*, 127(15), 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.022>
- Schulze, M., Nitsche-Melkus, E., Jakop, U., Jung, M., & Waberski, D. (2019). New trends in production management in European pig AI centers. *Theriogenology*, 137, 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.042>
- Silva, P. F. N., Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958-978. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
- Steverink, D.W.B., Soede, N.M., Bouwman, E.G., Kemp, B. (1998). Semen backflow after insemination and its effect on fertilisation results in shows. *Animal Reproduction Science*, 54(2), 109-119.
- Stone, B. A. (1981). Thermal characteristics of the testis and epididymis of the boar. *J. Reprod. Fert.* 63, 551-557. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0630551>

- Tittarelli, C., Savignone, C. A., Arnaudín, E., Stornelli, M.C., Stornelli, M.A., Luzbel de la Sota, R. (2006). Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*, 66(7-8).
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.021>
- Valverde, A., Madrigal-Valverde, M. (2018). Computer-assisted semen analysis systems in animal reproduction. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2)
<https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.30613>
- Valverde, A., Castro-Morales, O., Madrigal-Valverde, M., Soler, C. (2019). Análisis de subpoblaciones cinéticas y morfométricas de espermatozoides con sistemas CASA: revisión. *Biología Tropical*, 67(6).
<http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v67i6.35151>.
- Vazquez, J.M., Martinez, E.A., Roca, J., Gil, M.A., Parrilla, I., Cuello, C., Carvajal, G., Lucas, X., Vazquez, J.L. (2005). Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology*, 63(2), 536-547.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.043>
- Waberski, D., Luther, A.M., Grünther, B., Jäkel, H., Henning, H., Vogel, C., Peralta, W., Weitze, K. (2019). Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. *Scientific Reports*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51319-1>
- Waberski, D., Meding, S., Dirksen, G., Weitze, K. F., Leiding, C., Hahn, R. (1994). Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2), 145-151.
[https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)90061-2)
- Xu, Y., Han, Q., Ma, C., Wang, Y., Zhang, P., Li, C., Cheng, X., Xu, H. (2021). Comparative Proteomics and Phosphoproteomics Analysis Reveal the Possible Breed Difference in Yorkshire and Duroc Boar Spermatozoa. *Sec. Cellular Biochemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.652809>

Yeste, M., (2017). State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*, 14(1), 69-81. DOI: 10.21451/1984-3143-AR895

Žura Žaja, I., Samardžija, M., Vince, S., Vilić, M., Majić-Balić, I., Đuričić, D., & Milinković-Tur, S. (2016). Differences in seminal plasma and spermatozoa antioxidative systems and seminal plasma lipid and protein levels among boar breeds and hybrid genetic traits. *Animal Reproduction Science*, 170. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.006>

8. AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Pedro José y Fran, quienes han hecho que este trabajo sea posible. A mis compañeras de Spermatica Reproduccion, quienes me ayudaron durante el experimento.

También quiero agradecer a mi familia por apoyarme siempre, en especial a mi padre, quien me impulsó a estudiar esta carrera, y a día de hoy, puedo decir que he encontrado mi camino.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-106380RB-I00/AEI/10.13039/501100011033).

UNIVERSITAS
Miguel Hernández