

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

“UNIDAD LAGUNA”

DIVISIÓN DE REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



AVANCES EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CERDOS

POR:

IVONE CASTILLO GUTIÉRREZ

MONOGRAFÍA:

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

JUNIO 2013

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
“UNIDAD LAGUNA”**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



AVANCES EN INSEMINACION ARTIFICIAL EN CERDOS

ELABORADO POR:

IVONE CASTILLO GUTIÉRREZ

**ELABORADO BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR Y APROBADA
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR PRINCIPAL:

M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

ASESORES COLABORADORES:

M.V.Z. HILDA RUTH SAGREDO ULLOA

M.C. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ

M.C. ESEQUIEL CASTILLO ROMERO

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

JUNIO 2013.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

“UNIDAD LAGUNA”



DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

AVANCES EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CERDOS

IVONE CASTILLO GUTIÉRREZ

ASESOR PRINCIPAL


M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL


M.V.Z. RODRIGO ÍSIDRO SIMÓN ALONSO



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2013.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

“UNIDAD LAGUNA”



DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

AVANCES EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CERDOS

POR:

IVONE CASTILLOGUTIÉRREZ

**ELABORADO BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR Y
APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTAR POR EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MONOGRAFÍA APROBADA POR EL H. JURADO EXAMINADOR




M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA
PRESIDENTE



M.V.Z. HILDA RUTH SAGREDO U.
VOCAL



M.C. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ
VOCAL



M.C. ESEQUIEL CASTILLO R.
VOCAL SUPLENTE

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2013.

AGRADECIMIENTOS

A Dios primeramente por darme la oportunidad de dejarme llegar a donde estoy hasta este momento, y gracias por sus bendiciones, todas y cada una de ellas..

A mis padres porque me dieron la oportunidad de estudiar y el apoyo que me dieron para que lo lograré, gracias por su amor.

A mis hermanos, porque con el granito de arena que aportaron logre terminar.

A los maestros, a todos y cada uno de ellos que me compartieron sus conocimientos, los cuales me permitieron forjar mis conocimientos. Gracias a los que me brindaron su amistad y me dieron un buen consejo. En especial al M.C. Erneto Martínez Aranda por apoyarme y brindarme su amistad.

A mis amigos, que me apoyaron con sus consejos; especialmente a Rosy y Víctor que me apoyaron y ayudaron porque gracias a ellos pude culminar este último paso.

Gracias a todos y cada una de las personas que consiente e inconscientemente me ayudaron, gracias por las oraciones y buenos deseos.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, que son los que me dieron la vida y la formación que me permitió terminar mis estudios.

AVANCES EN INSEMINACION ARTIFICIAL EN CERDOS

INDICE

INTRODUCCION	1
Historia de la inseminación en porcinos.	1
Ventajas de la inseminación artificial en porcinos.	2
ANATOMÍA DE LA CERDA	3
Ciclo estral de la cerda.	4
ANATOMÍA DEL VERRACO	5
Características del semen porcino.	7
TÉCNICAS DE INSEMINACION ARTIFICIAL EN PORCINOS	7
Evaluación del eyaculado en el laboratorio.	7
INSTALACIONES DE UN CENTRO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN PORCINOS	9
MATERIALES DE LABORATORIO	10
AVANCES EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN PORCINOS.	12
Inseminación artificial intrauterina profunda.	12
Criopreservación del semen porcino.	13
Morfometría del espermatozoide porcino mediante análisis computarizado. -- -----	15
Sexaje del esperma porcino.	17
Encapsulación de semen porcino.	18
BIBLIOGRAFIA.	20

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial porcina (IAP) es una aplicación de la biotecnología, que consiste en el depósito de semen en el tracto genital de la hembra mediante diferentes instrumentos denominados pipetas o catéteres. (Decuadro-Hansen G. 2010)

La IAP fue utilizada por primera vez en la unión soviética en los años treinta, por Milovanov en 1932, y a partir de los años 60 y 70 se incrementa el uso práctico y comercial de la misma. La inseminación artificial porcina (IAP) no es una técnica nueva, en efecto los primeros intentos fueron realizados en la década de los años 30, Milovanov el cual práctico la IA con semen puro no diluido; los primeros trabajos prácticos de campo fueron realizados por investigadores japoneses quienes estudiaron la metodología de colecta de semen del verraco por intermedio de la utilización de « potros de monta » y de una vagina artificial así como la técnica de la IAP en sí, utilizando un catéter tipo «inflador de bicicleta». (Decuadro-Hansen G. 2013)

Es empleada para fines de mejora genética y disminución de costos principalmente en los países europeos de alto desarrollo, en los cuales el porcentaje de inseminación artificial es alto [de aproximadamente el 80%] (Decuadro-Hansen G. 2013)

Historia de la inseminación artificial en porcinos.

El primer éxito de inseminación en un mamífero lo consiguió Spallanzani, un sacerdote y fisiólogo italiano, que intento congelar semen con nieve, lo cual llevó a cabo en un perro en 1785. (Páez G. 2011)

Thouret lo aplico con su esposa en 1785, consiguiendo que esta quedara embarazada. La primera inseminación con un donante, la efectuó Pancoast, en 1884. Después de 100 años de 1885 Repiquet publicó su obra “Sobre las posibilidades teóricas de la utilización práctica de la inseminación” en la “Veterinaria Académie Francaise”. (Pesch S, Hoffmann B. 2007)

El desarrollo de esta técnica se debió sobre todo a su aplicación en la industria zootécnica, en la cría de animales de raza pura.

A partir de los años 90s la inseminación artificial se fue extendiendo, y su uso empezó a crecer ya que generó ventajas favorables para las explotaciones porcinas, disminuyendo costos y permitiendo el mejoramiento genético y sanitario y un mejor aprovechamiento de los sementales, ya que ello permite inseminar hasta 200 hembras más que la monta natural (Ciudad CC. 1984)

Para el buen funcionamiento de esta práctica, se requiere instalaciones adecuadas, personal capacitado y el número suficiente de verracos para cada explotación.

Ventajas de la inseminación artificial en porcinos.

Entre las ventajas que podemos obtener con el uso de la IAP se encuentran las siguientes:

- Disminución de la mano de obra.
- Disminución del número de machos.
- Mayor número de hembras inseminadas.
- Aumento de la producción.
- Control de cada semental.
- Disminución de transmisión de enfermedades por vía sexual.
- Existe la posibilidad de comprar semen y no tener semental en la granja
- Creación de centros especializados en inseminación artificial.
- Sincronización de partos e inseminaciones.
- Rápido cambio genético. (Ciudad CC. 1984)

ANATOMIA DE LA CERDA.

Los órganos que componen el aparato reproductor de la cerda son:

- 2 Ovarios.
- 2 Oviductos.
- El útero.
- La vagina.
- El vestíbulo.
- La vulva.

Ovarios: son órganos esenciales para la reproducción de la hembra, son glándulas de secreción endócrina (hormonas) y exocrinas (gametos). Se sitúan en la cavidad abdominal en la parte anterior de la cavidad pélvica. Su tamaño es de 4 x 2.5 x 2.5 cm. Y están irrigados por la arteria ovárica que es rama de la aorta y de la arteria uterina. (Trujillo OME et al. 2002)

Oviductos: Conductos sinuosos que llevan el ovocito al ovario respectivo al cuerno del útero, a la vez que sirve como lugar natural donde dicho óvulo puede ser fecundado por el espermatozoide. La porción del oviducto adyacente al ovario se despliega en forma de embudo (infundíbulo). El borde del infundíbulo, en forma de fleco, se llama fimbria. La luz del órgano presenta una mucosa con muchos pliegues, revestido por un epitelio cilíndrico ciliado simple. El resto de la pared comprende una submucosa de tejido conectivo, una capa de músculo liso circular y una superficie, otra capa conectiva cubierta de peritoneo. Su tamaño es de 20 cm. Sus componentes son: fimbrias, infundíbulo, ampolla, istmo, unión útero-tubárica. Secreta iones de lactato, piruvato, sodio, calcio y otros al momento de la ovulación y en la concentración de estrógenos para mantener los requerimientos del ovocito recién ovulado, favorecer al capacitación espermática, la fecundación o atender las necesidades del embrión recién formado.(Trujillo OME et al. 2002)

Útero: como muchos órganos internos huecos, la pared interna esta revestida de una mucosa (glandular, endometrio), bajo la cual se extiende la capa de músculo liso (miometrio) y encima el revestimiento del peritoneo. El cuello uterino o cérvix se proyecta en sentido caudal dentro de la cavidad de la vagina. Su tamaño es de 53 a 169 cm, esta irrigado por la arteria uterina, rama de la aorta. Es un músculo

de contracción, donde se transportan los espermatozoides, se expulsa el feto y placenta, hay absorción y fagocitosis, capacita al espermatozoide para la fecundación, provee un medio ambiente para el embrión y crecimiento del feto, produce hormona PGF2a. El cérvix está compuesto de tejido conectivo, secreta mucus cerca al estro y ovulación, transporta espermatozoide, es una barrera espermática, reservorio para espermatozoides, bloquea la invasión bacteriana durante la gestación y canal de parto. (Trujillo OME et al. 2002)

Vagina: es la porción del conducto del parto situada en la cavidad pelviana, entre el útero por delante y el vestíbulo caudalmente, sirve como receptáculo para recibir el pene durante la copula. La mucosa vaginal carece de glándulas, está formada de epitelio escamoso estratificado. Después de la submucosa laxa se extienden las capas musculares, una interna circular de fibras lisas y una externa longitudinal. Los fondos de saco vaginales se deben a la proyección del cuello. Sus partes son: fornix, vestíbulo, himen, abertura uretral y esfínter. Es un canal de parto y posee glándulas que secretan feromonas. (Trujillo OME et al. 2002)

Vestíbulo y vulva: el vestíbulo se localiza entre la vagina y la vulva. La unión de la vagina y el vestíbulo se marca por la presencia del orificio uretral externo, así como un pliegue inmediatamente craneal al orificio uretral externo, un vestigio de himen.

La vulva es la porción externa de los genitales de la hembra, extendidos desde el vestíbulo al exterior. Es una entrada a la vagina y un órgano sensorial y sus partes son labios y clítoris. (Trujillo OME et al. 2002).

Ciclo estral de la cerda.

La cerda es una hembra cíclica. Cada ciclo tiene una duración de 21 días y consta de cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro. (Ciudad CC. 1984)

Proestro: tiene una duración de unos tres días. Durante este período, en el organismo de la cerda tiene lugar una serie de cambios, debido a la separación del cuerpo lúteo, bajada de la tasa de progesterona y aumento de los estrógenos. Esto se traduce al exterior en una serie de síntomas de todos conocidos tales como intranquilidad, inapetencia, gruñidos típicos, intentos de salto a las

compañeras de alojamiento o dejarse montar por ellas, edematización de la vulva, etc. (Ciudad CC. 1984)

Estro: la duración media de esta fase es de unos dos días, y su característica más fundamental es que en estas 48 horas se produce la ovulación y de deberá hacer la inseminación artificial. (Ciudad CC. 1984)

El principal signo externo del estro es el llamado reflejo de guante, reflejo de tolerancia o reflejo de inmovilidad. Efectivamente la cerda en este período del ciclo permanecerá perfectamente inmóvil ante la presencia del verraco o ante ciertas maniobras realizadas por un operador. Estas maniobras pueden ser presiones en los flancos hasta la llamada “prueba de jinete”, pasando por presiones en el dorso. Para llevar un correcto control del celo es aconsejable guardar ciertas normas:

1°.- el control de celo se hará siempre después de las horas de comida, nunca antes. El mejor momento es inmediatamente después de concluida la comida.

2°.- deberá realizarse aproximadamente a las mismas horas.

3°.- es conveniente realizarlo dos veces al día, mañana y tarde. Los dos controles deben espaciarse lo más posible. (Ciudad CC. 1984)

4°.- el control de celo debe realizarlo siempre la misma persona.

Metaestro: dura unos 7 días. En este período desaparecen los síntomas del celo, se forma el cuerpo amarillo y vuelve a subir la tasa de progesterona. (Ciudad CC. 1984)

Diestro: mal llamado fase de reposo, ya que en ella el organismo empieza a prepararse para una nueva ovulación.

Esta fase dura unos 9 días, en los que externamente la cerda parece tranquila (Ciudad CC. 1984)

ANATOMIA DEL VERRACO.

Para comprender la reproducción, es necesario tener base de la anatomía del aparato reproductor del cerdo. (Buxadé CCI et al. 2007)

Testículos: Los testículos del cerdo son grandes y elípticos, tienen una capa fibrosa de color blanco que rodea a cada uno llamada túnica albugínea. Tienen un par de túbulos seminíferos, que es donde se lleva a cabo la formación de espermatozoides. (Buxadé CCI et al. 2007)

Epidídimo: es un conducto considerablemente largo, contorneado que conecta los conductos eferentes. (Buxadé CCI et al. 2007)

Conducto deferente: conducto que comunica a los testículos con el epidídimo. La red del testis se comunica con el deferente, lleva a los espermatozoides inmaduros a lo largo, que viene siendo el epidídimo. (Buxadé CCI et al. 2007)

Escroto: es un saco cutáneo que contienen a los testículos. (Buxadé CCI et al. 2007)

Túnica de dartos: es una capa de tejido fibroelástico que se encuentra debajo del escroto, esta pasa en el plano medio entre los dos testículos de modo que el saco escrotal está dividido en dos departamentos uno para cada glándula (Buxadé CCI et al. 2007)

Crest master: Músculo que sube y baja los testículos. (Buxadé CCI et al. 2007)

Pene: Órgano masculino de la cópula a través del cual pasa el semen y la orina. Su estructura es de tejido cavernoso [tejido eréctil] (Buxadé CCI et al. 2007)

Prepucio: Pliegue invaginado de piel que rodea la extremidad libre del pene.

Glándulas sexuales o ampollas: secretan la mayor parte de líquido seminal o semen, indispensables para transportar los espermatozoides, medio de su nutrición y amortiguador contra el exceso de acidez del conducto genital femenino (Buxadé CCI et al. 2007)

Ampolla: son dilataciones glandulares de las porciones terminales de los conductos deferentes. Estas glándulas vierten su secreción en los conductos deferentes compartiendo un mismo orificio eyaculatorio hacia el interior de la uretra (Buxadé CCI et al. 2007)

Próstata: es una glándula impar que rodea la uretra pélvica. En animales viejos puede hipertrofiarse y ser obstáculo de la micción. La secreción prostática alcalina, da al semen olor característico (Buxadé CCI et al. 2007)

Glándulas bulbouretrales (glándulas de cowper): son pequeños órganos situados a cada lado de la uretra pélvica, en el cerdo aportan una substancia gelatinosa característica del semen del cerdo.(Buxadé CCI et al. 2007)

Características del semen porcino.

El semen del cerdo se divide en tres fracciones:

Fracción proespermática: la constituyen secreciones de la próstata, vesículas seminales, es muy transparente, no contiene espermatozoides y su volumen es de 10 a 15 ml, no se debe de recoger puesto que su función principalmente es de limpieza del tracto genitourinario y puede tener contenido microbiológico. (Espinosa HS. 2002)

Fracción espermática: contiene la mayor proporción de espermatozoides 80 a 90%, su color es blanco lechoso y tiene una concentración de espermatozoides de 500 000 a 1000 000 por ml, el volumen oscila entre 3.040 a 90.100 cm³ de acuerdo a factores como la raza, intervalos de colecta, factores ambientales, alimentación y estado sanitario. (Parrilla PM. 2007)

Fracción posespermática: de color blanquecino transparente es muy pobre en espermatozoides, menos de 100 000 por ml³, rica en grumos gelatinosos. En la monta natural esta fracción sirve como taponamiento del útero luego de eyacular el macho, su fracción espermática. (Parrilla PM. 2007)

Evaluación del eyaculado en el laboratorio.

Una vez obtenido el eyaculado debe trasladarse al laboratorio lo más rápido posible para evitar cambios bruscos de temperatura, que pueden dañar a los espermatozoides y cualquier contaminación posible.; y medir:

Volumen: se mide en centímetros cúbicos o mililitros. Normalmente un macho reproductor eyacula entre 150 y 250 ml, pero puede variar entre 150 y 500 ml dependiendo la raza, edad y tamaño testicular (Parrilla PM. 2007)

Olor: el olor del semen tiene un olor proteico neutro. Olores fuertes y específicos. Se consideran anormales los olores a orina, putrefacto, etc.

Color: el color normal es el blanco lechoso. En caso de hemorragias, el color sería rosa. Se pueden presentar otros olores anormales debido a contaminaciones por exudados purulentos, bacterias, etc. (Espinosa HS. 2002)

Motilidad: se estudia el movimiento de los espermatozoides tanto en su modalidad individual (motilidad individual) como en conjunto (motilidad de masa.

Un eyaculado con menos de 60% de motilidad no debe emplearse en la inseminación artificial. (Parrilla PM.2007)

Concentración: igual que ocurre con el volumen, experimenta variaciones, que dependen de varios factores como la raza, edad, alimentación, medio ambiente, etc. (Parrilla PM.2007)

Se pueden considerar como valores normales los comprendidos entre los 600 000 a 800 000 espermatozoides/mm³. No obstante, existen verracos que dan cifras superiores al millón de espermatozoides por mm³. (Parrilla PM.2007)

pH: son cifras normales las comprendidas entre 6.9 a 7.8, siendo las más frecuentes las que oscilan entre 7.0 y 7.3.(Parrilla PM.2007)

Morfología espermática: un espermatozoide normal consta de cabeza, cuello, parte intermedia y flagelo, siendo por tanto una célula móvil y libre.

La longitud total de un espermatozoide es aproximadamente de 60 milimicras, de las que unas 8 milimicras pertenecen a la cabeza. La anchura de la cabeza es de unas 5 milimicras. (Espinosa HS. 2002)

La cabeza está constituida por el núcleo de la célula y está cubierta por la membrana nuclear. La parte anterior de la cabeza está cubierta por una especie de corona llamada acrosoma. El tracto intermedio y el flagelo son los responsables del movimiento del espermatozoide, movimiento que le hará progresar por el interior del conducto genital femenino hasta el encuentro del óvulo. (Espinosa HS. 2002)

Cualquier anomalía que dificulte la unión con el óvulo debe ser tomada en cuenta como posible factor que influya negativamente en los índices de fertilidad y fecundidad. Se pueden encontrar anomalías en la cabeza (macro y micro cabezas, cabezas desintegradas, etc.), y en la parte intermedia y flagelo (gotas citoplasmáticas, ovillos, látigos, colas sueltas, etc.).

Se considera que un semen es normal, en lo que a formas espermáticas se refiere, cuando el porcentaje de formas anormales no pasa de un 25%. (Torreta MA *et al.*2010)

Análisis microbiológicos: deben realizarse con periodicidad trimestral o cuando se sospeche de alguna posible contaminación con bacterias o virus; y se remitirán a una laboratorio especializado. (Torreta MA et al.2010)

Instalaciones porcinas.

- Entrada de animales y área de cuarentena.
- Nave de verracos o porquerizas.
- Área de extracción del semen.
- Laboratorio.
- Área de almacenamiento.
- Área de gestación y montas. (Parrilla PM.2007)

Área de cuarentena.

Es el área en donde se reciben los verracos nuevos que ingresan por primera vez a las instalaciones para irse aclimatando y monitorear que estén libres de enfermedades que puedan transmitir al hato. (de Alba RC.2008)

En esta área deben estar más de cuarenta días en condiciones favorables. Con un tapete sanitario a la entrada y salida para evitar contaminación. (Williams S.2010)

Nave de verracos o porqueriza. En esta área los verracos deben estar alojados en corrales independientes, construidos de material fácilmente lavable y provisto de comedero y bebedero, con una temperatura que oscila de 20 a 25 grados centígrados con buena ventilación e iluminación. (de Alba RC. 2008).

Área de extracción de semen.

El área de extracción será construida exclusivamente para ello y deberá emplearse material para su contrición de fácil limpieza.

Deberá estar diseñada con las medidas apropiadas para que el verraco no se distraiga (máximo 2 x 3 m), tener un muro hecho con barras de hierro colocadas a 40 o 70 cm para facilitar la salida al operario en caso de que el verraco se torne agresivo. (de Alba RC. 2008)

Colocar el potro en el centro y que este fijo, este debe permitir ajustar a la altura de cada verraco y va de los 50 a 75 cm de altura, longitud de 1.0 a 1.5 m, y ancho de 25.30 cm. Liso y de fácil limpieza ya que es una área que debe estar completa mente limpia, para evitar contaminación del semen. Tener un piso antiderrapante para que el verraco no sufra alguna lesión al momento de la monta. Y tener un área donde se realice previa limpieza a los machos antes de ingresar a esta área. (de Alba RC. 2008)

Laboratorio.

Debe construirse cerca del área de extracción para evitar transportar el semen distancias largas y sufrir algún daño. Tiene que estar provisto se lo necesario para la evaluación macroscópica y microscópica del semen. (Gonzales MM.2013)

Y un área de almacenamiento para guardas las dosis seminales.

Almacén.

Es un área donde debe estar regulada la temperatura (16 a 17° centígrados), para evitar que los espermatozoides sufran alguna degradación y puedan perder algunas de sus estructuras. (Gonzales MM.2013)

Área de gestación y monta.

En esta área se encuentran las hembras que han quedado preñadas y las recién destetadas, ya que deben estar en contacto con los machos para que inicien nuevamente su ciclo reproductivo.

El área de monta son corrales donde se lleva a cabo la monta natural. (Torreta MA *et al.*2010)

MATERIAL DE LABORATORIO.

- Termo de boca ancha para colección
- Guantes desechables para colección (de vinilo), y guantes higiénicos de plástico
- Microscopio con lente de 100x, 40x, 10x.
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Filtro para semen
- Pipeta volumétrica de 1 ml

- Dos termómetros de 12 pulgadas (lo ideal es que soporten temperaturas de más de 300 grados)

- Botellas de un litro para preparar el diluyente (tapa roja o tapa azul)
- Horno esterilizador.
- Bolsa estéril para colección de semen.
- Balón volumétrico de 100 ml.
- Suero formolado.
- Cámara de bunker o espermiométrico.
- Beacker grande
- Diluyente
- Agua destilada estéril
- Botellas de inseminación
- Nevera de conservación
- Baño maría
- Termómetro de máx. y min.
- Papel aluminio
- Cepillo para uñas
- Gavetas sin humedad para guardar materiales
- Vasos de icopor y viruta para transporte.
- Puntero abridor de frascos.
- Servilletas de mano
- Batas blancas de laboratorio
- tapa-bocas

- Chanclas (para evitar entrar con botas sucias al laboratorio). (Parrilla PM. 2007)

AVANCES DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.

En la última década la inseminación artificial en el mundo, a avanzado grandemente ya que la investigación en esta área ha sido constante y los avances científicos han permitido que aparte de la inseminación artificial convencional, ahora se realice de manera más profunda y con ello se utilice menor cantidad de esperma en el interior de los cuernos uterinos. (López SA. 2012)

Inseminación intrauterina profunda.

El doctor Emilio Martínez García de la universidad de Murcia España, desarrolla la técnica de inseminación intrauterina profunda, también conocida como transcervical profunda. (López SA.2012)

Por la complejidad del tracto genital de la cerda, determinado por la longitud y la curvatura de los cuernos uterinos y el canal cervical es imposible introducir instrumentos a los cuernos uterinos. Por ello el Dr. Martínez decide utilizar la técnica que se usa en perras, yeguas, ovejas; esta técnica permite depositar el semen en alguno de los cuernos uterinos. Sin ningún método de sedación. (Decuadro-Hanses G.2010)

La técnica consiste en introducir un catéter flexible en el interior de los cuernos uterinos (cerca de la unión uterotubarica), con ello reduciendo hasta en 80% el volumen y concentración de la dosis, con ello se puede reducir la dosis de 3×10^9 de espermatozoides por dosis a 3×10^7 y el volumen final utilizado de 80 a 100 ml hasta 5 ml sin afectar la fertilidad. (Decuadro-Hanses G. 2010)

La técnica se realiza introduciendo un catéter convencional previamente lubricado (semen, lubricante, etc.) hasta el cérvix, una vez que se fija en los primeros anillo cervicales; este se utiliza como guía para emplear un catéter flexible de 1.8 m de longitud, diámetro externo de 4 mm y un canal de trabajo interior de 1.8 mm. El cual impulsado por el cérvix se desliza hacia arriba al interior de los cuernos en toda su longitud y se aplica el semen. (López SA et al.2012)

Ello permite que los espermatozoides lleguen más rápido al sitio de fertilización sin tener que pasar obstáculos como las secreciones cervicales, reflujo y fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares. (Miranda CAF.2012)

La práctica de esta técnica permite obtener mayor número de dosis por verraco e intensificar el uso de los verracos en las granjas porcinas. El uso de esta práctica permite obtener cerca de 30,000 dosis /verraco/año.

En comparación con la inseminación artificial convencional. (Miranda CAF.2012)

Ventajas y desventajas de la IA IUP:

- Permite aumentar de 8 a 20 veces más el rendimiento de la inseminación ya que reduce el número de espermatozoides. (Mozo-Martín R.2012)
- Se optimiza el macho de alto valor genético para la diseminación más rápida de la misma; pero es necesario que la calidad espermática sea excelente.
- Es posible que en la granja se incremente el número de cerdas inseminadas con una sola eyaculación sin afectar el porcentaje de partos pero si ligeramente el número de camada.
- Es una herramienta de elección para la aplicación de nuevas técnicas en campo
- Esta técnica no se debe utilizar en cerdas nulíparas, pero si en cerdas de 3° celo previamente seleccionadas y con un buen desarrollo.
- No es una técnica sencilla y se necesita de personal previamente capacitado.
- El precio del catéter es muy alto, pero se justifica con la mejora genética. (Gonzales VD. 2008)

CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN PORCINO.

La criopreservación del semen porcino es la congelación del mismo en nitrógeno líquido. Esta práctica se realizó por primera vez en 1970 por el Dr. Polge en Cambridge; quien obtuvo por primera vez una camada con semen congelado. (Gadea J. 2005)

El proceso se inicia con la colección del semen, previo control de las condiciones de higiene y temperatura (33-35° C). Inmediatamente es diluido en BTS (diluyente salino) en la proporción de 1:6.

Las muestras se transportan al laboratorio a 15-17° C en nevera portátil con ácido acético glacial ya este se congela a 17°C y así permite que la temperatura descienda un poco y se consigan los 15° C. (Ramires NC et al. 2013)

Se debe tener en cuenta que el semen no puede congelarse hasta pasadas 4 horas y no más de 24 horas y pasadas 12 horas el semen decrece. (Ramires NC et al. 2013)

Pruebas de calidad espermáticas previas a la congelación.

La contrastación del semen resulta imprescindible para evitar problemas de fertilidad, que aunque esta prueba no sirve para predecir con exactitud la fertilidad,

si aporta elementos junto con otros exámenes que ayudan a valorar la capacidad reproductiva de los animales.

La contrastación se realiza a partir de las alícuotas del semen refrigerado del eyaculado que se congelará.

Valores mínimos de la calidad espermática antes de congelar.

Viabilidad espermática: integridad de la membrana plasmática del espermatozoide (mínimo 85%).

Resistencia osmótica de los acrosomas (ORT): determinación de la resistencia de los espermatozoides a los cambios de osmolaridad del medio (mínimo 80%).

Motilidad espermática total: movilidad de las células espermáticas en su conjunto (mínimo 85%).

Motilidad espermática progresiva: determinación del porcentaje de espermatozoides que avanzan hacia delante (mínimo 60%).

Morfología espermática: detección de anomalías morfológicas [mínimo un 85% de espermatozoides con morfología normal] (Tulsá M. 2011)

Congelación espermática.

Es el único método que existe para conservar esperma por tiempo indefinido, permite también el mejor aprovechamiento de reproductores de gran valor genético e importar y exportar dosis espermáticas.

PROCEDIMIENTO:

Existen dos etapas:

- una de enfriamiento previo (estabilización).
- otra de congelación propiamente dicha.

La de enfriamiento (hasta que el semen alcance 5° C) se procede a una fase de equilibrado a 15°C durante un mínimo de 4 horas. Se pasa después a analizar los parámetros seminales y, si la calidad es buena, se procede a eliminar el plasma seminal mediante centrifugación [1000g x 10 minutos] (Domínguez JC.2010)

Tras este paso, el precipitado de espermatozoide se suspende en un primer medio crio protector con glicerol. La concentración final de espermatozoides debe ser de 1×10^9 espermatozoides por ml. Finalmente se envasan los espermatozoides a 5 °C y se procede a la etapa de congelación. (Gadea J. 2005)

La velocidad de congelación varía así mismo según el envase (píldoras, maxi-pajuelas de 5 ml, pajuelas de 0.5 ml, mini-pajuelas de 0.25 ml o bolsas planas flat-pack) y el método empleado (el más utilizado es el almacenaje en pajuelas de 0.5 ml). (Tulsá M. 2011)

La congelación se realiza en un biocongelador programable conectado a una fuente de nitrógeno líquido. Posteriormente, las muestras se sumergen en el nitrógeno y se almacenan debidamente identificadas. (Tulsà M. 2011)

Descongelación de las pajuelas.

La descongelación a diferencias de la congelación, debe ser rápida para impedir el crecimiento de cristales de hielo, dañinos para los espermatozoides. Se introducen las pajuelas en el baño a 37 °C veinte segundos agitando de forma suave y constante. (Tulsà M. 2011)

Pasados los veinte segundos el contenido se vasa en un recipiente a una dilución no superior a 1:4 en BTS a 37 °C. El número de espermatozoides por pajuela es de 500 millones. La concentración de la calidad tras la descongelación se realiza en este momento. (Tulsà M. 2011)

Pruebas de calidad espermática.

Se lleva a cabo tras la descongelación, a los 30 minutos y a las cuatro horas. Sus valores óptimos son los siguientes:

- Viabilidad espermática: mínimo 40%.
- Resistencia osmótica de los acrosomas (ORT): mínimo 80%.
- Motilidad espermática total: mínimo 70%.
- Motilidad espermática progresiva: mínimo de 40%. (Tulsà M. 2011)

MORFOMETRÍA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE PORCINO MEDIANTE ANÁLISIS COMPUTARIZADO.

La valoración espermática ha sido utilizada en el examen tradicional del semen debido a que puede determinar las variaciones celulares que afectan la fertilidad. A medida que avanza la tecnología es obvio que existe heterogeneidad en los espermatozoides en forma individual. El análisis computarizado de los espermatozoides de una muestra seminal es en parte, responsable de la detección de la heterogeneidad y está siendo utilizada para realizar evaluaciones seminales, la cual facilita la evaluación rápida de un gran número de espermatozoides y determina varios aspectos de la funcionalidad espermática y garantizando una mejor relación con la capacidad fecundante del espermatozoide. (Gonzales VD.2008)

Uno de los aspectos que considera esta técnica es la morfología espermática. El análisis computarizado de la morfología espermática (Automated Sperm Morphology Analysis-ASMA-) da una determinación de las dimensiones y la forma del espermatozoide (morfometría) de una manera más

objetiva y reproducible, siendo utilizada en forma rutinaria para determinar problemas reproductivos en hombres y en forma experimental para determinar dimensiones individuales en bovinos, caballos, caprinos, ciervo rojo ibérico y conejo. (Gonzales VD.2008)

Con este análisis ha sido posible determinar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides en un mismo eyaculado de varias especies y se ha conseguido medir las dimensiones de la cabeza espermática de machos fértiles y sub-fértiles y ha sido de suma importancia para demostrar los efectos de la criopreservación sobre las dimensiones de la cabeza espermática. (González VD. 2008)

Recientemente, se ha desarrollado un método automático de evaluación espermatozoides morfometría nuclear (CASMA-F), la combinación de microscopía de fluorescencia y análisis de imágenes con el software de libre acceso que reduce los factores de efecto potencial sobre los resultados morfométricos. El uso del CASMA-F, espermatozoides de diferentes especies puede ser manchado con éxito con la misma sonda de fluorescencia, lo que permite una comparación directa entre las especies. En este trabajo, se ha aplicado este nuevo método desarrollado para comparar la morfometría nuclear de los espermatozoides de especies. (S Vicente-Fiel.2013)

El Dr. Decio Gonzales realizo el estudio en una granja comercial de Venezuela, utilizando eyaculado de 10 verracos de 2 años de edad, raza Dalland Tempo (Canadá); que fueron utilizados con una frecuencia de 2 veces por semana durante 12 meses. La extracción se obtuvo mediante manipulación manual, desechando la porción gelatinosa. Se midió el volumen, la motilidad, la calidad de movimiento. La calidad de movimiento se valoró según la escala de 0 a 5, donde 0 era movimiento nulo y 5 el movimiento rápido, progresivo y lineal.

La concentración de espermatozoides/ml, se diluyo con 1 ml de semen con 100 ml de solución salina formulada espermicida (9 g de cloruro de sodio, 3 ml de formol en 1000 ml de agua destilada). Se contaron los espermatozoides presentes en 5 de los 25 cuadros de la misma. El volumen ocupado por los 5 cuadros a contar, multiplicado por la dilución, origina el factor de multiplicación (5000) y la concentración espermática resulta de la siguiente ecuación:

Concentración de espermatozoides/ml = N° de espermatozoides contados x 5000.

Las muestras con motilidad mayor de 10x10espermatozoides, se diluyeron con el producto comercial MR-A (Kubus, España) en una cantidad suficiente para que resulte una concentración final de 40 x 10, espermatozoides por L, de esta muestra se hicieron extendidos en portaobjetos, de muestras tomadas después de envasado el semen en botellas de plástico desechables y envasado a 16 °C por 24 horas. (Gonzales VD et al. 2010)

Las pruebas de vitalidad y morfología se realizaron en semen fresco y refrigerado. Se colocó 10 microlitros en un portaobjetos previamente calentado a 37 °C en platina termorregulable y se le agregó 10 ml de colorante eosina-nigrosina, homogenizado suavemente haciendo un frotis, dejando secar por 30 min. Los frotis fueron observados en el microscopio óptico, para lo cual se contaron un total de 200 espermatozoides por frotis, el resultado final se expresó en porcentaje de espermatozoides vivos. (Gonzales VD et al.2010)

Para la morfología los espermatozoides fueron clasificados según su apariencia en normales (apariencia normal) y anormales (con presencia de morfoanomalías) y expresados. Estos últimos incluían: defectos de cabeza (número, tamaño y apariencia), defectos de la pieza intermedia (ubicación y apariencia), anomalías en el flagelo (numero, forma y tamaño), presencia de gota citoplasmática proximal (GCP) y distal (GCD), además se determinó el porcentaje de espermatozoides con alteración de acrosomas, descrito de manera individual. (Vicente-Fiel S.2013)

Para evaluar la morfometría de la cabeza espermática se utilizó sobre los frotis de semen fresco y refrigerado la tinción hemacolor, 24 horas más tarde las muestras teñidas fueron permanentemente fijadas en los portaobjetos con fosfato dibútil xileno (DPX). La evaluación del ASMA se realizó mediante el software sperm-classAnalyzer, microptic. Este sistema consta de un microscopio de campo claro y una cámara de video, conectada a un procesador Pentium. La intensidad de la fuente de iluminación y el desplazamiento de la cámara fue igual para todas las muestras. Las muestras fueron grabadas en formato de video y digitalizadas con 256 niveles de grises. Las dimensiones para el largo (L), ancho (W), área (A), perímetro (P) fueron tomadas de 225 a 230 frotis. Este número aseguraba un mínimo de 150 medidas de cabeza espermática por muestra y aquellas medidas de cabeza inapropiadas fueron excluidas del análisis. (Vicente-Fiel S.2013)

Análisis estadístico. Todos los datos obtenidos fueron analizados mediante Statical Analisis System software 8.2 para Windows. El efecto de proceso de refrigeración, calidad espermática, dimensiones de cabeza, se analizaron de varios eyaculados de cada verraco utilizando el modelo lineal general de análisis de la varianza, cuando se encontraron diferencias entre las medidas se cuantifico el efecto mediante el procedimiento LSMEANS. Del mismo modo y con el propósito de identificar la presencia de subpoblaciones espermáticas de las muestras obtenidas fueron sometidas a un análisis multivariado de agrupamiento no jerárquico mediante el procedimiento "FASTCLUS", el cual agrupa a los espermatozoides, según sus características morfométricas comunes. Los espermatozoides con dimensiones muy parecidas se les asigno un grupo o "cluster". (Vicente-Fiel S.2013)

Sexaje de espermatozoides porcinos.

El logro de esta técnica fue por el Dr. Lawrence Jonson, Técnico-fisiólogo del servicio de investigaciones agrícolas de Beltsville, en Maryland, y fue patentada por el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) en 1992.

La técnica se basa en la mayor cantidad de ADN que existe en los espermatozoides portadores de un cromosoma "X" respecto a los espermatozoides portadores del cromosoma "Y", estos son necesarios para que con presencia den origen a un individuo de sexo macho. En el cerdo los espermatozoides con cromosoma "X" tienen un 3.6% más de ADN que los que portan un cromosoma "Y". Mientras mayor es la diferencia en el contenido de ADN, más fácil es la separación de los espermatozoides con un mayor grado de pureza o confiabilidad. (Arrollo A. 2008)

Los concentrados para ser sexados deben tener niveles de concentración mayor a 1×10^9 esp/ml y motilidad progresiva mayor o igual al 60%. Este semen es teñido con un colorante (Hoechst 33342) que penetra la membrana espermática y se adhiere al ADN, y tiene la propiedad de producir fluorescencia cuando se le somete a la luz de un rayo láser: a mayor cantidad de ADN (espermatozoides con cromosoma "X"), mayor fluorescencia o luminosidad. Mediante la utilización de un aparato 'separador de células' conocido técnicamente como "citómetro de flujo", se detecta esta diferencia en la fluorescencia de los espermatozoides, la cual es procesada por un software que permite seleccionar la población de espermatozoides con mayor ('X') o menor luminosidad ('Y'), seleccionarlos y desviarlos del flujo original, y recolectarlos en un tubo para su congelación. (Arrollo A. 2008)

La computadora en realidad clasifica los espermatozoides en tres grupos: los que portan el cromosoma "X", los que portan el cromosoma "Y", y una población mixta de portadores de los dos tipos de cromosomas, que no han podido ser clasificados con claridad. Después, mediante un vibrador los distintos grupos se fraccionan en micro-gotitas (a razón de 70/80 mil por segundo) portadoras de un espermatozoide en cada una, que pasan por un dispositivo que les asigna una carga eléctrica positiva o negativa, según la clasificación hecha por la computadora; finalmente, se le hace pasar por un campo magnético donde aquellas con carga positiva son atraídas hacia el lado negativo y viceversa. Así se forman tres corrientes de gotas, que se pueden coleccionar en tres tubos de ensayo diferentes, para separar los espermatozoides X e Y. (Arrollo A. 2008)

Los laboratorios encargados de comercializar el semen sexado, luego de su congelación evalúan su motilidad progresiva y la pureza (proporción del semen elegido) de las dosis producidas, las cuales para ser aceptadas deben tener como mínimo 35% de espermatozoides motiles y 85% de pureza. (Parrilla. 2005)

Encapsulación de semen porcino.

La microencapsulación del semen porcino ha sido creada para extender el tiempo de conservación de los espermatozoides y maximizar la eficiencia de una única inseminación. El Dr. Vigo realiza una investigación con estas cápsulas de doble y triple inseminación artificial. El cerdo es una especie de ovulación múltiple y no se producen al mismo tiempo, las cerdas puede durar el estro de 30 a 72 horas, con variación en el inicio de estro-ovulación. Cuando la inseminación se realizó demasiado tarde, la reducción de la concepción, pueden ocurrir bajas tasas de fertilidad y mayor pérdida de embriones. Y si se realiza temprano la inseminación, el espermatozoide no puede soportar el lapso de tiempo de la ovulación. La solución común es utilizar inseminaciones secuenciales (dobles y triples) para cubrir toda la ovulación. (D.Vigo.2009).

El proceso de micro encapsulación ha sido adaptado al semen de cerdo, con alginato de bario sin diluir, la gota de semen para asegurar nutrientes moleculares e intercambio de metabolitos, proporcionando taponamiento del pH para evitar el choque de dilución. (D. Vigo.2009).

El Dr. Vigo realiza la investigación con eyaculado de 23 verracos, la extracción fue manual observando la concentración espermática y la viabilidad. A los eyaculados se agregó una solución saturada de BaCl₂ para llegar a una concentración de iones Ba²⁺ de 25 mmol/L; se añadió gota a gota la suspensión restante en un 0.55 de solución de alginato de sodio (viscosidad media) con agitación continua. Se empleó la técnica de extrusión con una bomba peristáltica, por lo que el semen es forzado a través de una aguja (25GX/8 de pulgada) a una velocidad de flujo de 60 gotas por minuto. Después de aproximadamente 1 hora, las cápsulas se recogieron por filtración y se enjuagó dos veces con extensor de esperma porcino (solución acuosa que contiene glucosa 60g /L y De NaHCO₃ 1.2g/ pH 7.2) y se suspendieron en la misma solución (relación volumétrica cápsula : extensor 1: 0.3) la suspensión resultante de las cápsulas fue volumétricamente dividida en dosis calculadas a contener 2.5 millones de espermatozoides en botella de polietileno comprimibles y se añadió un diluyente a un volumen de 80 ml. El volumen de dosificación para la suspensión para cada uno se forma calculando la siguiente ecuación: $Dv = \frac{1}{4} S v \frac{0.2}{0.5} = C s \frac{E v}{n}$

Dv= al volumen de suspensión de la cápsula para cada dosis (ml).

Sv= volumen total de suspensión de cápsula (ml).

Cs= concentración de espermatozoides en el eyaculado (espermatozoides/ml).

Ev= volumen de la eyaculación extruido (ml).

2.5= factor de la obtención de 2.5 millones de espermatozoides/dosis. (Spinaci M. 2013).

BLIOGRAFIA

Buxadé CCI. 2007. Capitulo VII La problemática de la fecundación eficaz (monta/ IA). La cerda reproductora: Claves de su optimización productiva. Ediciones Euroganadería. Madrid, España. pp. 285-302. ISBN 13:978-84-8476-331-4

Ciudad CC.1984. Inseminación artificial en ganado porcino. Hojas divulgadoras del ministerio de agricultura Pesca y Alimentación. Centro Nacional de Selección y Reproducción Animal. Valdepeñas, Ciudad Real. No 5/84 HD. Publicaciones de extensión agraria. Corazón de María, 8. Madrid-2.I.S.B.N.: 84341-0351-6 Neografu, S. L. - Santiago Estévez, 8 - Madrid-19.

González VD, Quintero-Moreno A, Garde JJ López-Brea, Estesó CM, María Fernández-Santos R, Rubio-Guillén J, Willian Mejía SW, González MY, León AG, Bohórquez CR. Revista Científica, vol. XVIII, núm. 5, pp. 570-577, septiembre-octubre 2008. Redalyc. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95918507>.

Decuadro-Hansen, G. 2013. Avances en inseminación artificial porcina. IMV Technologies. 10, Rue Clémenceau 61302, L'Aigle FRANCE. <http://www.umoar.edu.sv/biblio/agricultura/animales/porcinocultura/cerdos%20inseminacion%20artificial.pdf>.

Espinoza HS. 2002. Inseminación artificial. La perra reproductora. 1º edición. Pag 165-168. Barcelona España.

Gadea J. Artículos porcinos. Evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante fecundación in vitro. Departamento de biología animal. Facultad de veterinaria Universidad de Murcia España. Vol 16(1). <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia.asp?ref=3473&cadena=porcinos&como=2>

de Alba RC: 2008. Entrenamiento del verraco para la producción de dosis seminales en centros de inseminación artificial. Reproducción e IA. Avances. Minitub Ibérica S.L. Av. Tecnol. Porc. V (9): xx-xx. Vol. 5. http://www.minitube.de/BR_por/content/download/5614/155694/version/7/file/LA+INSEMINAC%C3%8DON+INTRAUTERINA+EN+CERDOS+-+BENEFICIOS+Y+RIESGOS.

Gila L, Gómez-Rincónb CF, Dahmanic Y, García-Tomásc M, Úbedac JL, Grandíad J. Theveterinary Journal.-1 july 2012. Page 251-256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.11.007>.

Tulsà M, Casas I, Soler J. 2011. Banco de germoplasma porcino selecto. SUIS. No.75. Marzo 2011. Pp. 22-27

Páez, G.2011. Aspectos clínicos de la inseminación homóloga ¿Es actualmente una técnica eficaz?persbioét. Vol. 15 Número 1.Págs. 25-39. I.S.S.N. 0123-3122.

Trujillo OME, Martínez GRG, Herradora LMA. 2002. Aspectos básicos dela morfología y del semental. La Piara Reproductora. Mundi Prensa México. Barcelona España. 1º edición Pág. 103 - 111.

R .Mozo-Martín, L. Gil, C.F. Gómez-Rincón, Y. Dahmani, M. García-Tomás, J.L. Úbeda, J. Grandía.2012.Use of a novel double uterine deposition artificial insemination technique using low concentrations of sperm in pigs.TheVeterinaryJournal. Volumen 193, Issue 1, July 2012, Pages 251–256.

Domínguez, J.C.; Cisale, H.; Kirkwood, R.; Breininger, E.; Gonzalez, R.; Tejerina, F.; Alegre, B.; Alegre, E.; Peláez, J.; García, J.C.; Bernal, S.; Cárdenas, S.; Córdova, C.A.; Abad, M.; Abad, F.; Manjarin, R. y Martín.2010. Criopreservación del semen porcino. Facultada de veterinaria de la universidad de León. Facultad de medicina veterinrira de la Universidad de Buenos Aires Argentina. Large Animal ClinicalSciences Michigan StateUniversity. Centro tecnológico de inseminación artificial. Artículo porcino<http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia.asp?ref=729&cadena=porcinos&como=2>.

Vicente-Fiel S, Palacín I, Santolaria P, Hidalgo CO, Silvestre MA, Arrebola F, Yániz JL. 2013. A comparative study of the sperm nuclear morphometry in cattle, goat, sheep, and pigs using a new computer-assisted method (CASMA-F). Theriogenology.Vol.79. Pág.436-442.

Arrollo A.2008. Sexado del semen una nueva herramienta para la industria de la producción de carne. Revista Angus, Bs. As., 241 Pp 37-39. www.produccion-animal.com.ar. P

Vigo D, Faustini M, Villani S, Orsini F, Bucco M, Chlapanidas T, Conte U, Ellis K, M.L. Torre.2009.Semen controlled-release capsules allow a single artificial insemination in sows. Theriogenology. Universidad de Milán Italia. Vol.72.Pág. 439-444.www.theriojournal.com.

Espinosa HS. 2002. Aspectos básicos de la morfología de la cerda y el semental. La piara reproductora. 1º edición. Barcelona España. Pp. 165-186.

Spinaci M, Chlapanidas T, Bucci D, Vallorani C, Perteghella S, Lucconi G, Communod R, Vigo D, Galeati G, Faustini M, Torre ML. 2013. Encapsulation of sex sorted boar semen: Sperm membrane status and oocyte penetration parameters. *Theriogenology*. Universidad de Italia. Vol. 79. Pág. 575-581. www.theriojournal.com.

López SA, Pinto CJM, Toledo CM. 2012. Evaluación de la técnica de inseminación poscervical. *Suis*. Vol. 89. 2012. Pp 14-20.

Ramires NC, Monteiro GA, Soares RF, Pedrazzi C, Dell'acqua Jr JA, Papa FO, Castro-Chaves MM, Alvarenga MA. 2013. New insemination plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*. Vol. 79. pp. 1120-1123.

Parrilla I, Vásquez J.M, Martínez E.A. 2005. Evaluación de la inocuidad del proceso de separación espermática por citometría de flujo en el ganado porcino. *Anales de veterinaria*. Vol. 21. Murcia España. <http://revistas.um.es/analesvet/article/view/2861/2781>.

Parrilla P M. 2007. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Programa Nacional de cerdos. Sistema unificado de información institucional. Fundación para el fomento y promoción de la investigación y transferencia de tecnología agropecuaria en Costa Rica. Manual de porcicultura. San José Costa Rica, 2007. www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00111.pdf.

Pesch S, Huffmann B. 2007. J. Cryopreservation of Spermatozoa in Veterinary Medicine. *Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology*. 4 (2), 101-105.

Torreta MA, Rabaglino MB, Ferrero S. 2010. Caracterización cuali-cuantitativa de patologías espermáticas estudio comparativo de la incidencia de anomalías espermáticas en semen porcino fresco y refrigerado. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, vol. 11, núm. 12. Diciembre, 2010, pp. 1-20. España. ISSN (Versión electrónica): 1695-7504. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63616936007>.

Williams S. 2010. Manejo de verracos para centros de inseminación artificial. *PORCUCULTURA*. http://www.porcicultura.com/porcicultura/home/articulos_int.asp?cve_art=620.

Tulsa M, Casas I, Soler J. 2011. Banco de germoplasma porcino selecto. *Suis*. Vol. 75.

López S. A, Pinto C. JM, Toledo C. M. 2012. Evaluación de la técnica poscervical. *Revista SUIS*. Vol. 89. Jul- Agosto 2012. Consultado el 20 de mayo del 2013.

Edipor. 2010. Especial genética e inseminación 2010. Pág. 12-19. <http://www.ediporcguia.com/revistas>. Consultado el 13 de mayo del 2013.

