



# ¿Podemos mejorar la eficiencia de la IA en porcino?

● Roca AJ, Parrilla I, Bolarín A, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H.

## RESUMEN

La inseminación artificial (IA) es ampliamente usada en la producción porcina, alcanzando resultados de fertilidad similares a los obtenidos con la monta natural. Sin embargo, no es un proceso totalmente eficiente, ya que un verraco ofrece anualmente alrededor de 2000 dosis de IA, casi exclusivamente producidas en fresco. Esto restringe el comercio internacional y supone un freno para la mejora genética. Los esfuerzos en investigación revisados en este trabajo tienen como objetivo revertir este escenario ineficiente. Pondremos especial atención a los estudios que pretenden disminuir el número de espermatozoides empleados por cerda preñada, facilitando el uso práctico de semen congelado-descongelado y sexado en programas comerciales de IA.

## INTRODUCCIÓN

El ritmo de producción y la demanda de consumo de la carne de cerdo están en continua progresión en el mundo. Actualmente, la producción animal debe ser sostenible y altamente eficiente, y debe ser compatible y respetuosa con el medio ambiente<sup>1</sup>. Pero debe también mantener la competitividad, porque cada vez es más cierto que la producción animal porcina es una actividad globalizada. En este contexto, incrementar el progreso genético en las poblaciones porcinas para producir más y mejor carne con el menor número de animales es crítico para disminuir la presión medioambiental, tanto en términos de producción de piensos como de manejo y tratamiento de purines. Las tecnologías reproductivas, principalmente la IA y la transferencia de embriones, parecen las mejores vías para diseminar el progreso genético, y mejorar así las poblaciones<sup>2</sup>. Aunque se ha experimentado un sustancial progreso en preservación y transferencia embrionaria no quirúrgica durante los últimos años en la especie porcina, su implementación práctica a nivel comercial todavía parece lejana (revisado en <sup>3</sup>); esto deja a la IA prácticamente como única herramienta disponible para la diseminación global de genes en la especie porcina.

La IA en el porcino comenzó hace más de 50 años, y hoy es práctica general en la producción mundial (revisado en <sup>4</sup>). Durante los primeros 30 años, la IA fue considerada más una herramienta de ayuda a los ganaderos en la mejora del manejo de la cría animal, que prevenía además la diseminación de enfermedades venéreas, más que un medio para acelerar el progreso genético. En este contexto, la efectividad prevalecía sobre la eficiencia lo

cual desgraciadamente sigue siendo cierto en muchos casos hoy en día. El procedimiento más usado hoy día en las granjas de porcino implica el uso de semen líquido (almacenado 1-5 días a 15-17° C) y la deposición cervical de un gran número de espermatozoides por cerda en estro (normalmente 5-7x10<sup>9</sup> espermatozoides por celo)<sup>4</sup>. Este procedimiento es efectivo, alcanzando fertilidades similares a la monta natural; pero es ineficiente, porque limita la diseminación de los verracos genéticamente más valiosos a no más de 2000 cubriciones anuales. Además, muchas de las dosis servidas comercialmente derivan de la mezcla de varios (normalmente tres) eyaculados, en lugar de provenir de uno solo, un procedimiento que puede obstaculizar el progreso genético<sup>5</sup>. Esta ineficiencia contrasta con la situación en la industria de vacuno, en la que el uso de semen congelado y el bajo número de espermatozoides usado por celo hace posible que un solo toro semental pueda ofrecer 50000 cubriciones anuales<sup>6</sup>.

Parece evidente que la industria de la IA porcina debe enfocarse en contribuir a la mejora genética. En esta revisión postulamos que esto puede conseguirse mediante la disminución sustancial del número de espermatozoides requeridos para preñar una cerda (lo cual básicamente incrementa el número de dosis de IA producidas por verraco), facilitando además el uso de otras tecnologías más allá del semen líquido refrigerado. Esto implica el uso de semen congelado y cromosómicamente sexado sin afectar a la fertilidad. El principal objetivo de esta revisión es escudriñar los cambios que debe afrontar la IA porcina para convertirse en una herramienta más útil de lo que es hoy día para el progreso genético global, con el objetivo de cubrir la demanda proteica de base animal en una población en continuo crecimiento.

## DISMINUYENDO EL NÚMERO DE ESPERMATOZOIDEOS POR CERDA PREÑADA

Durante los últimos años hemos sido testigos de un avance en el campo de la disminución práctica del número de espermatozoides necesarios para preñar una cerda. El catéter de IA convencional, que deposita el semen de la dosis de IA en el cérvix, está siendo gradualmente reemplazado por el llamado catéter de inseminación intrauterina o postcervical (IUI), que deposita el contenido de la dosis de IA en el cuerpo del útero. El catéter IUI fue concebido hace más de 40 años, pero no ha demostrado su utilidad comercial hasta 2002<sup>7</sup> empleando 1.500 millones



de espermatozoides totales por dosis de IA. Desde entonces, numerosas revisiones han discutido en detalle particularidades sobre la IUI, incluyendo materiales, manejo, volumen, número de espermatozoides por dosis de IA, y resultados de fertilidad (revisado en<sup>9-11</sup>). El catéter IUI es barato, fácil de usar, ahorra tiempo de IA, y no requiere entrenamiento sofisticado, consiguiendo resultados de fertilidad similares a la IA tradicional, pero usando significativamente menos espermatozoides, porque la deposición de espermatozoides en el cuerpo uterino reduce su pérdida por refluj<sup>12</sup>. Debido a su buena fertilidad, el uso comercial de la IUI está en evidente expansión en casi todos los países con producción porcina significativa<sup>11</sup>. Paralelamente a esta expansión, se han llevado a cabo numerosas pruebas que pretenden definir el mínimo de espermatozoides necesarios para mantener una máxima fertilidad (comparada con la IA tradicional). A pesar de los numerosos esfuerzos, no hemos logrado consenso en el número de espermatozoides mínimo estándar<sup>10</sup>. Revisando los resultados de las pruebas con IUI (Tabla 1), parece obvio que podemos lograr una elevada fertilidad con sólo 750 millones de espermatozoides totales cuando tanto el manejo en granja como la calidad de la dosis seminal son óptimos<sup>13</sup>. Sin embargo, podemos extraer como consecuencia que para conseguir sistemáticamente buenos resultados mediante la IUI, debemos emplear al menos  $1 \times 10^9$  espermatozoides totales por dosis. A parte de la disminución del número de espermatozoides, los esfuerzos también se dirigen a la disminución el número de IAs

por estro. Rozeboom y cols.<sup>14</sup> reportaron que el momento de inseminación respecto de la ovulación era más importante que el número de espermatozoides y/o de dosis de IA empleados. Actualmente, las cerdas se inseminan con semen fresco refrigerado 1,7 a 2,6 veces por estro, según el país. Sólo una de estas IA preña a la cerda, la aplicada más próxima a la ovulación en una ventana estimada entre 12 h antes y 4 h después de la ovulación<sup>15</sup>. Esta única IA sería suficiente para asegurar la gestación, y resultaría en un significativo beneficio económico al disminuir no sólo el coste de la dosis, sino la mano de obra y otros costes asociados. Además, cuanto menos semen usemos, más dosis de IA tendremos disponibles, lo cual incrementa inmediatamente la posibilidad de diseminar eyaculados de verracos genéticamente mejorantes. Además, una sola IA por estro sería crucial a la hora de implementar el semen congelado y sexado.

Pronosticar el momento de ovulación es crucial, y es posible con un buen manejo de la reproducción en la granja, basado en una correcta y frecuente detección y control del estro y su duración, porque como es sabido, la ovulación sucede a los dos tercios de la duración total del estro<sup>16</sup>. Un excesivo número de IA por estro suele ocultar un pobre manejo reproductivo. Una exacta determinación de la duración del estro en una granja es simple, barato y fácil de implementar, pero raramente usado en las granjas porque emplea mucho tiempo, ya que la duración del estro varía significativamente entre las cerdas de una misma explotación, inversamente al intervalo destete-cubrición. Cuanto menor ➤



➤ es este intervalo, mayor será la duración del estro. Además, también observamos variabilidad entre granjas<sup>17</sup>, lo cual exige distintas estrategias de IA para cada intervalo destete-estro y para cada granja. Con todo, esta determinación no debería ser descartada, con el objetivo de eliminar la aplicación de la tercera dosis de IA por estro de manera rutinaria.

La IA a tiempo fijo en cerdas con ovulación hormonalmente inducida es ideal para disminuir el número de IA por estro. El procedimiento es práctico porque no requiere de detección de estro, disminuye la mano de obra, e incrementa los resultados reproductivos. El objetivo último es la aplicación de una sola IA por estro. En el mercado hay numerosas hormonas disponibles para sincronizar la ovulación tras la inducción del crecimiento folicular con FSH o su agonista natural eCG. Los más efectivos son la LH porcina o su agonista natural hCG (que actúan a nivel ovárico) y la GnRH natural o sus análogos sintéticos como Buserelina o Goserelina (que actúan a nivel de la glándula pituitaria). Para más detalles, ver la revisión de Brüssow y cols.<sup>18</sup> y Kirkwood y cols.<sup>19</sup>. Un protocolo que incluya LH porcina y una sola IA a tiempo fijo 36 h tras su aplicación, tuvo como resultados tasas de parto y prolificidad similares al grupo control (no tratado, y con dos IA por estro)<sup>20</sup>. Recientes estudios han obtenidos los mismos prometedores resultados inseminando 30-33 horas tras la aplicación de Buserelina (Driancourt y cols.<sup>21</sup>). Es importante tener en cuenta que hay diferencias entre países en cuanto a la

disponibilidad comercial de productos para inducir ovulación. Además, y por causas de bienestar animal, la vía inyectable está bajo discusión hoy día en muchos países, sobre todo en la UE, lo que fuerza a la búsqueda de métodos de aplicación alternativos, como vacunas sin aguja, o aplicaciones intravaginales en gel<sup>22</sup>. Una sola IA con semen encapsulado podría ser una alternativa a considerar, porque podría realizarse independientemente del momento de ovulación. La encapsulación espermática es una tecnología desarrollada en los ochenta<sup>23</sup>, aún no implementada hoy día en ganadería. La encapsulación consiste en el encerramiento de gotas de semen concentradas dentro de una membrana semipermeable de alginato de bario, que permite el intercambio de nutrientes y metabolitos con el medio y que se desintegra lentamente, liberando gradualmente a los espermatozoides contenidos en las distintas membranas<sup>24</sup>. Una vez en el útero, la lenta liberación de semen viable asegura un número adecuado de espermatozoides funcionales listos para fertilizar cuando suceda la ovulación. Los resultados obtenidos hasta hoy son prometedores, alcanzándose tasas de parto de 84,97% y 12,56 lechones nacidos totales mediante una sola IA con  $2,5 \times 10^9$  espermatozoides encapsulados al inicio del estro en una prueba que incluyó 4245 IA<sup>25</sup>. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con 2-3 IA convencionales (82,36% tasa de partos y 12,79 lechones nacidos totales). Sin embargo, todavía hay cuestiones prácticas a resolver, relacionadas con

la preparación, almacenamiento, transporte y eliminación del semen encapsulado y el alginato subproducto en el centro de inseminación, antes de que esta tecnología pueda ser usada a nivel comercial<sup>24,26</sup>.

## IDENTIFICACIÓN TEMPRANA DE VERRACOS POTENCIALMENTE SUBFÉRTILES

La disminución del número total de espermatozoides por cerda preñada persigue la máxima difusión de los mejores verracos a través de la IA. Ciertamente, los centros de inseminación contemplan un escenario para los próximos años en el que hasta 6000 inseminaciones podrán realizarse con semen de un solo verraco (datos de *Artificial Insemination Management Ibérica*, España). Para conseguirlo son necesarios cambios en los sistemas de producción, como seguramente el cambio de heterospermias a monospermias<sup>5</sup>. Consecuentemente, la clásica imagen de un centro de inseminación tradicional con limitados recursos, que aloja una pequeña cantidad de verracos, normalmente asociados a una misma granja, está evolucionando rápidamente a grandes unidades independientes y altamente especializadas y tecnificadas, que alojan a grandes cantidades de verracos de sanidad comprobada y genéticamente superiores, que producen diariamente una gran cantidad de dosis seminales siguiendo estrictas regulaciones y pautas para prevenir alarmas sanitarias y fallos<sup>27</sup>. Este progreso estructural ha sido liderado por los centros de inseminación artificial mediante la incorporación de métodos más precisos y exactos de valoración espermática, como el sistema CASA y/o la citometría de flujo<sup>11</sup>, lo que resulta en mejores resultados de fertilidad en granja. A pesar de este progreso en profesionalidad, se estima que entre el 5% y el 7% de verracos subfértiles permanecen escondidos en la población de verracos de los centros de inseminación<sup>27</sup>, porcentaje que bien podría incrementarse substancialmente con la reducción de espermatozoides en la dosis de IA, ya que esto podría evidenciar problemas de subfertilidad en verracos que antes no la evidenciaban con dosis de IA convencionales<sup>28</sup>. Los verracos y sus eyaculados son seleccionados en los centros de inseminación mediante espermiogramas, que incluyen número de espermatozoides, motilidad y morfología, lo cual es útil para detectar verracos y/o eyaculados con potencial fértil deficiente, pero que son desafortunadamente incapaces de identificar verracos o eyaculados subfértiles. En este escenario, los centros de inseminación artificial deberían completar los espermiogramas tradicionales con nuevos sistemas de valoración capaces de identificar verracos subfértiles, idealmente antes de incorporarlos a los programas de reproducción. Además, estos sistemas complementarios deben ser económicamente rentables. Recientemente, Roca y cols.<sup>27</sup> propusieron una batería de nuevos sistemas de evaluación espermática que incluía la evaluación de la integridad del ADN nuclear espermático, el análisis citogenético en busca de traslocaciones recíprocas, y técnicas de fertilización *in vitro*, que cumplirían el requisito de realizarse una vez en verracos jóvenes antes de entrar en el

centro de inseminación, y ser predictivos de la capacidad fértil de ese verraco.

## USO DIARIO DE SEMEN CONGELADO Y SEXADO EN PROGRAMAS DE IA COMERCIALES

En el siglo XXI es sorprendente que la aplicación del semen congelado en porcino se mantiene marginal. La industria porcina ha ignorado sistemáticamente los beneficios potenciales del uso del semen congelado en cuanto a bioseguridad, flexibilidad de uso, y comercio internacional. La evidencia más clara al respecto es que actualmente sólo alrededor del 1% de las inseminaciones realizadas en el mundo lo son usando semen congelado<sup>29</sup>.

Los avances conseguidos en los métodos de criopreservación durante los últimos 15 años, incluyendo la composición de los diluyentes de congelación y descongelación y el conocimiento de que no todos los verracos son aptos para la criopreservación, han demostrado que las dosis criopreservadas hoy día pueden resultar en una buena calidad y funcionalidad espermáticas tras su descongelación<sup>30</sup>. Ciertamente, la motilidad y viabilidad espermáticas posdescongelación se sitúan por encima del 70% usualmente, con resultados de fertilidad próximos a los obtenidos con semen fresco refrigerado. De hecho, Didion y cols.<sup>31</sup> reportaron una tasa de partos del 78,7% y un tamaño medio de camada de 12,5 lechones en un estudio de campo que implicaba a más de 2.600 cerdas inseminadas tres veces por celo con  $2 \times 10^9$  espermatozoides motiles. Consecuentemente, el escaso uso del semen congelado en la granja debe ser explicado de otra manera: el requerimiento de gran cantidad de espermatozoides por cerda preñada y el complicado manejo que la dosis de semen congelado exige en la granja y la elevada inconsistencia en los resultados<sup>4,9</sup>. Respecto a esto último, Bolarin y cols.<sup>32</sup> mostró que la variabilidad entre pruebas en los resultados de fertilidad era mayor usando semen congelado comparado con el uso de semen líquido refrigerado.

Hay ya algunas herramientas disponibles para superar algunos de estos inconvenientes. La inseminación intrauterina profunda (DUI), que deposita el semen en lo profundo de un cuerno uterino<sup>33</sup> es una técnica comercialmente disponible (*DeepBlue AI Catheter*, Minitüb, Alemania) y de demostrada eficacia en semen congelado. Sin embargo, los requerimientos de entrenamiento de personal y el precio del catéter hacen preferible el semen líquido refrigerado. La DUI sería el procedimiento de elección en la aplicación de semen congelado, porque sólo requiere  $1 \times 10^9$  espermatozoides totales descongelados para conseguir resultados de fertilidad similares a los de la IA convencional<sup>34</sup>. Los espermatozoides congelados tienen un muy corto periodo de vida útil (estimado en 6-8 h) una vez depositados en el útero<sup>15</sup>. Así, para alcanzar buena fertilidad, la IA debe realizarse en una estrecha ventana de tiempo antes de la ovulación. Ciertamente, Bolarin y cols.<sup>35</sup> encontró tasas de parto del 81,1% y 9,93 lechones totales nacidos por camada en cerdas con ovulación inducida e inseminadas dos veces mediante DUI usando sólo  $1 \times 10^9$  ➤



➤ espermatozoides totales por dosis, próxima al momento de ovulación. Los mismos autores llegaron a similares conclusiones independientemente del número de espermatozoides totales inseminados ( $1 \text{ ó } 2 \times 10^9$  de espermatozoides), probando que el momento de ovulación respecto del momento de IA es más importante para la fertilidad del semen congelado que el número de espermatozoides contenidos en una dosis de IA. Además, pruebas de cubriciones llevadas a cabo por Bolarín y cols.<sup>32-35</sup> mostraron también que la variabilidad en los resultados de fertilidad obtenidos del uso de semen congelado entre granjas, en diferentes pruebas de IA e incluso en diferentes estaciones del año, era despreciable cuando la IA era realizada poco antes de la ovulación.

Finalmente, la complejidad del manejo del semen congelado frente a las dosis refrigeradas, incluyendo el cuidadoso proceso de descongelación y la dilución posterior en un diluyente apropiado que mitigue la toxicidad del crioprotector e incremente el volumen de la dosis de IA, requiere de entrenamiento y trabajo adicional, lo cual frustra el uso práctico del semen congelado en la granja. La investigación debe enfocarse en simplificar estos procedimientos. Desafortunadamente, los productores de materiales para reproducción porcina no parecen muy interesados, argumentando el limitado uso del semen congelado en la industria, lo cual es en sí mismo una incongruencia. Un buen ejemplo es la falta de interés en la comercialización del sistema de envasado de semen congelado *FlatPack*, el cual ha demostrado su superioridad frente a la pajuela tradicional<sup>36,37</sup>.

El uso práctico de los espermatozoides sexados en los programas de IA abrirían una nueva dimensión en la industria porcina (para más detalles, ver<sup>38</sup> y <sup>39</sup>). El semen sexado tiene el potencial de expandir el progreso genético, pues permite producir sólo hembras, previniendo además la castración, lo cual es un problema de bienestar animal hoy día en la UE. Actualmente, el único método comercialmente viable para el sexado espermático es la "Tecnología de sexado espermático Beltsville", que supone la separación de las poblaciones de espermatozoides que contienen el cromosoma X e Y mediante citometría de flujo aplicada a muestras previamente incubadas con el fluorocromo *Hoeschst 33342*, que se liga al ADN espermático<sup>40</sup>. La separación de estas dos poblaciones es posible debido a la diferencia en el contenido de ADN, un 3,6% mayor en el cromosoma X que en el Y<sup>41</sup>. Esta diferencia mínima dificulta la capacidad del citómetro de flujo para identificar correctamente a todos los espermatozoides, haciendo que el proceso sea más lento de lo esperado. Ciertamente, en el mejor de los escenarios, usando citómetros de alta velocidad, el número de espermatozoides X e Y separados con una pureza de al menos el 90% apenas excede los 20 millones por hora<sup>42</sup>. Esta velocidad es aceptable para producir dosis de IA de bovino, que requieren de pocos millones de espermatozoides por dosis<sup>43</sup>, pero no para producir dosis de IA de porcino, que al menos deberían contener 500 millones de espermatozoides. Consecuentemente, mejorar la eficien-

cia del procedimiento actual es un reto para la aplicación del semen sexado a nivel comercial. Alternativamente, otros procedimientos más eficientes que la citometría de flujo podrían ser desarrollados. Por ejemplo, la investigación ha conseguido la identificación de secuencias específicas del cromosoma Y mediante el uso de nanopartículas de oro bifuncionales y técnicas de hibridación triplex *in vivo*, junto con el desarrollo de un sistema de desviación láser que reemplaza la selección espermática mediante campo electrostático<sup>44</sup>. Además, la selección en paralelo mediante microfluidos está en estudio para evitar la complejidad de la orientación necesaria de los espermatozoides en el citómetro, lo cual aumentaría significativamente la velocidad de sexado<sup>42</sup>.

Un obstáculo añadido en la aplicación comercial del semen sexado es su especial sensibilidad ante la criopreservación tras el sexado. Tras el proceso, el semen sexado puede tolerar el almacenamiento líquido a 15-17°C hasta 120 h<sup>45</sup>. Este tiempo es insuficiente, sin embargo, debido a que el procedimiento de sexado por citometría de flujo requiere de demasiado tiempo para seleccionar suficientes espermatozoides en la especie porcina. Así pues, la criopreservación parece ser el único método útil para almacenar el semen sexado. Hemos reportado que el semen sexado y criopreservado de porcino muestra unos valores de recuperación aceptables en cuanto a motilidad y viabilidad tras la descongelación<sup>46</sup>, pero desafortunadamente la fertilidad obtenida de su uso es pobre<sup>47</sup>. Así pues, se necesita más investigación para optimizar los protocolos de criopreservación de semen sexado. Otra restricción para la aplicación práctica del semen sexado en la industria es la ineficiencia de las técnicas actuales de IA. Ni la convencional, que requiere de al menos  $1,5 \times 10^9$  espermatozoides por dosis, ni la IUI, que requiere al menos 500 millones son de utilidad, debido al hecho de que aún los citómetros de alta velocidad sólo podrían ofrecer 300-400 millones de espermatozoides sexados cada 24 h. Por lo tanto, requerimos de procedimientos de IA alternativos que requieran muchos menos espermatozoides por dosis de IA. La inseminación intrauterina profunda (DUI) podría ser de utilidad, considerando una fertilidad del 47% y 9,2 lechones nacidos totales con sólo 140 millones de espermatozoides sexados por dosis de IA<sup>48</sup>. Sin embargo, la todavía gran cantidad de espermatozoides requeridos, junto con la baja fertilidad limita la posibilidad de considerar a la DUI como candidata para aplicar el semen sexado en granja. No obstante, la DUI podría ser una técnica de primera elección cuando los ratios de sexado mediante citometría mejoren.

Hoy día, la inseminación laparoscópica, a pesar de su alto coste y complicada ejecución, es el único procedimiento que permite el uso eficiente de semen sexado<sup>48</sup>. El procedimiento incluye la deposición directa de los espermatozoides en la unión uterotubárica y/o en la ampolla tubárica, donde se requieren menos espermatozoides para una exitosa fertilización<sup>8</sup>. Pruebas recientes han mostrado tasas de parto del 80% y un promedio de 10,8 lechones nacidos totales tras una sola inseminación laparoscópica en cerdas sincronizadas hormonalmente, depositando uno y dos millones de espermatozoides sexados

frescos en cada oviducto y cuerno uterino respectivamente<sup>49</sup>. Estos excelentes resultados de fertilidad abren la posibilidad para el uso del semen sexado a nivel industrial, al menos en las granjas núcleo y multiplicadores donde la inversión (equipo de cirugía y entrenamiento de personal) podría ser rentable, aunque esto no debe relajar la investigación que necesariamente debe realizarse para conseguir métodos de IA menos costosos que permitan la aplicación del semen sexado en los programas comerciales.

### PLASMA SEMINAL (PS), UNA MINA POR DESCUBRIR

Los eyaculados de porcino contienen una gran cantidad (normalmente más de 150 ml) de plasma seminal, la mayoría del cual es descartado durante la recolección manual del semen. Recientes descubrimientos revelan la compleja composición del PS<sup>50-52</sup>, destacando la importancia de algunos de sus componentes, como la glutatión-peroxidasa 5<sup>53</sup> o la paraoxonasa I<sup>54</sup> para mejorar la fertilidad de las dosis refrigeradas de IA. Sin embargo, otros componentes del PS, como las espermadhesinas PSP-1 y AQN-3, podrían perjudicar la fertilidad del espermatozoides<sup>53,55</sup>. Este contraste funcional en los componentes del PS debería ser considerada antes del uso del PS como diluyente post-descongelación, lo cual conlleva resultados de fertilidad inconsistentes<sup>56,57</sup>.

La relevancia del PS sobre la fertilidad podría ser más decisiva dado que los centros de inseminación, por razones higiénicas y de eficiencia, están apostando por sistemas semiautomáticos de recolección seminal, que recogen el eyaculado al completo, incluyendo la fracción posespermática, más pobre en espermatozoides pero especialmente rica en proteínas. El PS de porcino es especialmente rico en citoquinas (un total de 14 han sido recientemente descubiertas en cantidades significativas<sup>52</sup>). Las citoquinas actúan como señales para el sistema inmune de la hembra una vez dentro del sistema genital, modulando la tolerancia materna hacia el embrión y el desarrollo placentario, condicionando así el desarrollo embrionario y/o fetal<sup>58</sup>. Los exosomas, pequeñas vesículas membranosas extracelulares que modulan la funcionalidad celular, también merecen atención, ya que están sustancialmente presentes en el plasma seminal. Se especula con que los exosomas del PS juegan un rol importante en la motilidad espermática, protegiendo a los espermatozoides en el tracto genital de la hembra, y facilitando su capacidad fecundante<sup>59</sup>.

Estos descubrimientos sugieren que mejorando nuestro conocimiento sobre la composición del PS junto con la apropiada identificación de los componentes del PS involucrados en la funcionalidad espermática y su fertilidad podría ayudar en la predicción del potencial fértil de los verracos, y podría ayudar a la formulación de nuevos diluyentes seminales que logren no sólo mantener la funcionalidad espermática, sino mejorar la capacidad fecundante de los espermatozoides. Necesitamos nuevos diluyentes que mejoren la vida útil de los espermatozoides criopreservados y sexados<sup>30,47</sup>.





## CONCLUSIONES Y RETOS FUTUROS

➤ La IA en porcino está progresando enormemente, pero aún tiene excitantes retos por delante cuya consecución debería ayudar sustancialmente a la industria a alcanzar una producción más eficiente. Todos los retos apuntan en la misma dirección: conseguir la máxima fertilidad con IA únicas a tiempo fijo usando muy pocos espermatozoides de los verracos genéticamente mejores, idealmente empleando la tecnología de la criopreservación. En el presente hay líneas de investigación muy variadas en marcha para alcanzar estos objetivos, las más interesantes enfocadas al desarrollo de nuevos sistemas de IA, a la producción eficiente de dosis de IA libres de patógenos, el establecimiento

de tratamientos hormonales saludables para determinar el momento de ovulación, y la mejora de la eficiencia del sexaje espermiático. Sin embargo la industria de porcino debe contribuir de forma más activa para que la IA sea la herramienta que dirija la mejora en la eficiencia, incorporando las tecnologías reproductivas emergentes antes mencionadas, incluso asumiendo que su implementación podría requerir algunos cambios sustanciales en los programas actuales de reproducción. Finalmente, la investigación debe esforzarse en el PS, el cual parece contener tanto la causa como la solución a algunos problemas de fertilidad, y que podría abrir nuevas posibilidades al uso del semen criopreservado y sexado en las granjas. 

## Referencias bibliográficas

- [1] FAO. Bruinisma Jelle, editor. World agricultura: towards 2015/2030. A FAO perspective. ISBN: 92 5 104835 5, [www.fao.org/3/a-y4252e.pdf](http://www.fao.org/3/a-y4252e.pdf); 2003.
- [2] Gerrits RJ, Lunney JK, et al. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology* 2005;63:283-99.
- [3] Martínez EA, Cuello C, Parrilla I, Martínez CA, Nohalez A, Vázquez JL, et al. Recent advances toward the practical application of embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 2016;85:151-61.
- [4] Konx RV. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology* 2016;85:83-93.
- [5] Foxcroft GR, Patterson J, Cameron A, Dyck MK. Application of advanced AI technologies to improve the competitiveness of the pork industry. 2010. Proceedings of the 21<sup>st</sup> IPVS Congress, Vancouver, Canada. July 18-21:25-29.
- [6] Vishwanath R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* 2003;59:571-84.
- [7] Watson PF, Behan JR. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology* 2002;57:1683-93.
- [8] Roca J, Hernández M, et al. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 2006;84:2692-9.
- [9] Roca J, Parrilla I, Rodríguez-Martínez H, Gil MA, Cuello C, Vázquez JM, et al. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. *Reprod Domest Animal* 2011;46:79-83.
- [10] Bortolozzo FP, Menegat MB, Mellagi AP, Bernardi ML, Wentz I. New artificial insemination technologies for swine. *Reprod Domest Anim* 2015;50:80-4.
- [11] Broekhuijse MLWJ, Gaustad AH, Bolarin Guillen A, Knol EF. Efficient boar semen production and genetic contribution: the impact of low-dose artificial insemination on fertility. *Reprod Domest Anim* 2015;50:103-9.
- [12] Hernández-Caravaca I, Izquierdo-Rico MJ, Matas C, Carvajal JA, Vieira L, Abril D, et al. Reproductive performance and back-flow study in cervical and post-cervical artificial insemination in sows. *Anim Reprod Sci* 2012;136:14-22.
- [13] Olesen AK, Hansen C. Intrauterine insemination of sows by using a two-chamber semen bag system. *Soc Reprod Fertil* 2009;66:81-2.
- [14] Rozeboom KJ, Reicks DI, Wilson ME. The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. *J Anim Sci* 2004;82:2164-8.
- [15] Waberski D, Weitze KF, Gleumes T, Schwarz M, Willmen T, Petzoldt R. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology* 1994;42:831-40.
- [16] Soede NM, Kemp B. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 1997;52:91-103.
- [17] Kemp B, Soede NM. Relationship of weaning-to-estrus interval to timing of ovulation and fertilization in sows. *J Anim Sci* 1996;74:944-9.
- [18] Brüßow KP, Scheneider F, Kanitz W, Rátky J, Kauffold J, Wähler M. Studies on fixed-time ovulation induction in the pig. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2009;66:187-95.
- [19] Kirkwood RN, Kauffold J. Advances in breeding management and use of ovulation induction for fixed-time AI. *Reprod Domest Anim* 2015;50:85-9.
- [20] Cassar G, Kirkwood RN, Poljak Z, Bennett-Steward K, Robert M. Effect of single or double insemination on fertility of sows bred at an induced estrus and ovulation. *J Swine Health* 2005;13:254-8.
- [21] Driancourt MA, Cox P, Rubion S, Harnois-Milon G, Kemp B, Soede NM. Induction of an LH surge and ovulation by buserelin (as Receptal) allows breeding of weaned sows with a single fixed-time insemination. *Theriogenology* 2013;80:391-9.
- [22] Knox RV, Taibl JN, Breen SM, Swanson ME, Weibel SK. Effects of altering the dose and timing of triptorelin when given as an intravaginal gel for advancing and synchronizing ovulation in weaned sows. *Theriogenology* 2014;82:379-86.
- [23] Nebel RL, Barne JH, Saacke RG, Lim F. Microencapsulation of bovine spermatozoa. *Anim Sci* 1985;60:1631-9.
- [24] Faustini M, Vigo D, Spinaci M, Galeati G, Torre ML. Enhancing insemination performance in pigs through controlled release of encapsulated spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2012;47:353-8.
- [25] Vigo D, Faustini M, Villani S, Orsini F, Bucco M, Chlapanidas T et al. Semen controlled-release capsules allow a single artificial insemination in sows. *Theriogenology* 2009;72:439-44.

- [26] Perteghella S, Viganì B, Crivelli B, Spinaci M, Galeati G, Bucci D et al. Sperm encapsulation from 1985 to date; technology evolution and new challenges in swine reproduction. *Reprod Domest Anim* 2015;50:98-102.
- [27] Roca J, Broekhuijse ML, Parrilla I, Rodríguez-Martínez H, Martínez EA, Bolarín A. Boar differences in artificial insemination outcomes: can they be minimized? *Reprod Domest Anim* 2015;50:48-55.
- [28] Flowers WL. Increasing fertilization rate of boars: influence of number and quality of spermatozoa inseminated. *J Anim Sci* 2002;80:E47-53.
- [29] Knox RV. The fertility of frozen boar sperm when used for artificial insemination. *Reprod Domest Anim* 2015b;50:90-7.
- [30] Yeste M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. *Reprod Domest Anim* 2015;50:71-9.
- [31] Didion BA, Braun GD, Duggan MV. Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Anim Reprod Sci* 2013;137:189-96.
- [32] Bolarín A, Hernández M, Vázquez JM, Rodríguez-Martínez H, Martínez EA, Roca J. Use of frozen-thawed semen aggravates the summer-autumn infertility of artificially inseminated weaned sows in the Mediterranean region. *J Anim Sci* 2009;87:3967-75.
- [33] Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, et al. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *Reproduction* 2001;122:289-96.
- [34] Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vázquez JM, Martínez EA. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 2006;60:77-87.
- [35] Bolarín A, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Hernández M, Vázquez JM, Martínez EA, et al. Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. *Theriogenology* 2006;65:669-80.
- [36] Ekwall H, Hernández M, Saravia F, Rodríguez-Martínez H. Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of boar semen frozen in medium-straws and MiniFlatPacks. *Theriogenology* 2007;67:1463-72.
- [37] Eriksson BM, Petersson H, Rodríguez-Martínez H. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology* 2002;58:1065-79.
- [38] Rath D, Johnson LA. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reprod Domest Anim* 2008;43:338-46.
- [39] Sharpe JC, Evans KM. Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology* 2009;71:4-10.
- [40] Johnson LA, Rath D, Vázquez JM, Maxwell WMC, Dobrinsky JR. Preselection of sex in swine for production: current status of the process and applications. *Theriogenology* 2005;63:615-24.
- [41] Garner DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 2006;65:943-57.
- [42] Rath D, Tiedemann D, Gamrad L, Johnson LA, Klein S, Kues W, et al. Sex-sorted boar sperm – an update on related production methods. *Reprod Domest Anim* 2015;50:56-60.
- [43] Seidel Jr GE. Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* 2014;8:160-4.
- [44] Rath D, Barcikowski S, et al. Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects. *Reproduction* 2013;145:R15-30.
- [45] Alkmin DV, Parrilla I, Tarantini T, Del Olmo D, Vázquez JM, Martínez EA, et al. Seminal plasma affects sperm sex sorting in boars. *Reprod Fertil Dev* 2014.
- [46] Parrilla I, del Olmo D, Caballero I, Tarantini T, Cuello, Gil MA, et al. The effect of glycerol concentrations on the post-thaw in vitro characteristics of cryopreserved sex-sorted boar spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2012;47:965-74.
- [47] Spinaci M, Perteghella S, Chiapanidas T, Galeati G, Vigo D, Tamanini C, et al. Storage of sexed boar spermatozoa: limits and perspectives. *Theriogenology* 2016;85:65-73.
- [48] Vázquez JM, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Cuello C, Vázquez JL, et al. Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology* 2009;71:80-8.
- [49] Del Olmo D, Parrilla I, Sánchez-Osorio J, Gomis J, Ángel MA, Tarantini T, et al. Successful laparoscopic insemination with a very low number of flow cytometrically sorted boar sperm in field conditions. *Theriogenology* 2014;81:315-20.
- [50] Strzezek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklinska M, Mogielnicka M, Soliwoda D, et al. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol* 2005;5:279-90.
- [51] López Rodríguez A, Rijsselaere T, Beek J, Byt P, Van Soom A, Maes D. Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. *Syst Biol Reprod Med* 2013;59:5-12.
- [52] Barranco I, Ruber M, Pérez-Patiño C, atikuzzaman M, Martínez EA, Roca J, et al. The seminal plasma of the boar is rich in cytokines, with significant individual and intra-ejaculate variation. *Am J Reprod Immunol* 2015;74:523-32.
- [53] Novak S, Ruiz-Sánchez A, Dixon WT, Foxcroft GR, Dyck MK. Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. *J Androl* 2010;31:188-200.
- [54] Barranco I, Tvarijonaviciute A, Pérez-Patiño C, Alkmin DV, Ceron JJ, Martínez EA, et al. The activity of paraoxonase type 1 (PON-1) in boar seminal plasma and its relationship with sperm quality, functionality and in vivo fertility. *Andrology* 2015;3:315-20.
- [55] May N, Patterson JL, Pinilla JC, Carpenter A, Werner T, Triemert E, et al. Seminal plasma proteins associated with boar fertility. *Reprod Domest Anim* 2015;50:110.
- [56] Okazaki T, Akiyoshi T, Kan M, Mori M, Teshima H, Shimada M. Artificial insemination with seminal plasma improves the reproductive performance of frozen-thawed boar epididymal spermatozoa. *J Androl* 2012;33:990-8.
- [57] Kirkwood RN, Vadnais ML, Abad M. Practical application of seminal plasma. *Theriogenology* 2008;70:1364-7.
- [58] Robertson SA, Prins JR, Sharkey DJ, Moldenhauer LM. Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. *Am J Reprod Immunol* 2013;69:315-30.
- [59] Barkalina N, Jones C, Coward K. Nanomedicine and mammalian sperm: lessons from the porcine model. *Theriogenology* 2016;85:74-82.