

**UNIVERSIDAD DE LEÓN**



**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Medicina Animal: Sanidad Animal**

**Estudio del reservorio espermático utero-tubárico, recuperación de la decapitación espermática y momento de inseminación respecto a la ovulación como factores críticos de la fertilidad y prolificidad del semen descongelado en la especie porcina**

**Miguel Abad Valcarce**

**2015**



## TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

**1. Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts.** M Abad, DJ Sprecher, P Ross, RM Friendship, RN Kirkwood. *Reproduction of Domestic Animals* 42, 149-152 (2007)

**2. Effect of insemination-ovulation interval and addition of seminal plasma on sow fertility to insemination of cryopreserved sperm.** M Abad, JC Garcia, DJ Sprecher, G Cassar, RM Friendship, MM Buhr, RN Kirkwood. *Reproduction of Domestic Animals* 42, 418-422 (2007)

**3. Practical application of seminal plasma.** RN Kirkwood, ML Vadnais, M Abad *Theriogenology* 70, 1364-1367 (2008).



A quien me enseñó todo lo que en esta vida quiero ser,  
a mi padre



## Agradecimientos





A lo largo de los años que ha durado la elaboración de esta tesis hay muchas personas que han participado haciéndola posible. Si no todos aparecen aquí mencionados es exclusivamente debido a la fragilidad de mi memoria y a la necesidad de mantener este capítulo en extensiones razonables, para todos ellos mis agradecimientos más sinceros.

Quiero agradecer muy especialmente,

A mi madre, ejemplo de sacrificio y entrega desinteresados, por quien todo lo que hiciera en esta vida nunca sería suficiente, y a quien nada me gustaría más regalar que una pizca del mismo orgullo que ella provoca en sus hijos.

A mi hermano Francisco, con quien he vivido las mejores y peores experiencias de esta vida, por ser la persona con la que sin duda volvería a vivirlas. A Silvia, por ser quien y como es.

Al profesor Fernández Tejerina, quien ha sido, es y será mucho más que el codirector de esta tesis. Su presencia en los momentos más difíciles son la muestra verdadera del sentimiento recíproco de pertenencia a una misma familia.

Al profesor Roy Kirkwood, quien me acogió en su familia y equipo en los Estados Unidos de América, haciendo posibles todos los trabajos aquí presentados. Por poder decir con orgullo que el profesor e investigador es además ahora un verdadero amigo.

A los profesores José Cibelli, Natalie Trottier, Missy Vadnais, Pablo Ross y el resto de doctores y estudiantes de postgrado de la Universidad Estatal de Michigan con los que colaboré y de los que tanto aprendí durante la elaboración de los principales trabajos de investigación que aquí presento.

Al profesor Robert Friendship y su equipo, Glen Cassar, Cesar Corzo, Svonimir Poljak, Arturo Ruiz, Christine Pelland y el resto de profesores y postgrados de la Universidad de Guelph, con los que tuve la suerte de poder compartir experimentos y experiencias únicas durante mis repetidas estancias en Canadá.

A la profesora Lina Fernández, porque con su carácter y generosidad siempre mejora la vida a todos los que tenemos la suerte de tenerla alrededor.

Al profesor Emilio Espinosa, a quien me une una relación genuina de respeto y afecto heredada de años atrás, y a quien debo especialmente haber retomado la escritura de esta tesis.

A Beatriz Alegre, Raúl González, José Carlos García, y resto de compañeros y amigos que formaron el equipo de CENTROTEC S.A. durante los años en que realicé mi formación en León. A ellos les debo mucho más que el modo de valorar correctamente la calidad seminal de verraco que repetidamente fue utilizado en las experiencias de esta tesis. Mucho más. Gracias de nuevo.

A los profesores Villar, Suárez, Soler, Zorita, Anadón y Jimeno por ser para mí durante este tiempo referentes académicos y humanos de lo que mi padre nos enseñó que es la Universidad.

A mi mujer Beatriz, por haber añadido su esfuerzo y entrega personal para que yo haya podido finalizar esta tesis, y por hacer que cada día sea mejor que el anterior mostrando siempre lo que verdaderamente importa en esta vida. **Gracias de corazón Bea**, sigamos construyendo el futuro.

Y sin duda a nuestras hijas, Irene y Sofía, por haber cambiado la dimensión de nuestro mundo, a otra infinitamente mejor.

## Indice



Índice de tablas.....	xv
Índice de figuras.....	xvii
Abreviaturas.....	xix
<b>Resumen general.....</b>	<b>1</b>
Capítulo 1. Introducción.....	5
Capítulo 2. Revisión bibliográfica.....	11
Capítulo 3. Objetivos.....	43
Capítulo 4. Artículo I.....	47
<i>Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. Reproduction of Domestic Animals 42, 149-152 (2007)</i>	
Capítulo 5. Artículo II.....	53
<i>Effect of insemination-ovulation interval and addition of seminal plasma on sow fertility to insemination of cryopreserved sperm. Reproduction of Domestic Animals 42, 418-422 (2007)</i>	
Capítulo 6. Artículo III.....	61
<i>Practical application of seminal plasma. Theriogenology 70, 1364-1367 (2008).</i>	
Capítulo 7. Resultados globales y discusión.....	69
Capítulo 8. Conclusiones.....	81
Capítulo 9. Bibliografía.....	85



## Índice de Tablas

Pág.

<b>Tabla 1.1.</b> Características de un eyaculado típico de verraco.....	36
<b>Tabla 1.2.</b> Volumen y número de espermatozoides en el reflujo seminal durante IA (M1), 30 min post IA (M2) y 30min-2.5h post IA (M3).....	37
<b>Tabla 1.3.</b> Momento óptimo de inseminación relativo al momento de primera detección de estro (presión dorsal).....	42
<b>Tabla 1.4.</b> Protocolos de sincronización hormonal basados en la administración de hCG.....	44
<b>Tabla 4.1.</b> Effect of freezing and supplementation with seminal plasma on number of sperm recovered from the oviduct and uterotubal junction (experiment 1).....	55
<b>Tabla 4.2.</b> Effect of freezing and supplementation with seminal plasma on number of sperm recovered from the oviduct and uterotubal junction (experiment 2).....	56
<b>Tabla 5.1.</b> Farrowing rates and total born litter sizes following artificial insemination of fresh sperm or frozen-thawed sperm with or without 10% supplemental seminal plasma inseminated 2 or 12h before ovulation (experiment 1).....	64
<b>Tabla 5.2.</b> Farrowing rates and total born litter sizes following artificial insemination of fresh sperm or frozen-thawed sperm with or without 10% supplemental seminal plasma inseminated 2 or 12h before ovulation (experiment 2).....	64
<b>Tabla 6.1.</b> Effect of freezing and supplementation with 10% seminal plasma on number of sperm recovered from the oviduct and utero-tubal junction of gilts.....	70
<b>Tabla 6.2.</b> Farrowing rates and total born litter sizes following artificial insemination of fresh sperm or cryopreserved sperm, with or without 10% supplemental seminal plasma inseminated at 2 or 12 h before ovulation.....	71
<b>Tabla 7.1.</b> Efecto de la congelación y suplementación con plasma seminal en el número de espermatozoides recuperados de la unión uterotubárica. Resultados del experimento 1.....	76
<b>Tabla 7.2.</b> Efecto de la congelación y suplementación con plasma seminal en el número de espermatozoides recuperados de la unión uterotubárica. Resultados del experimento 2.....	77





<b>Índice de Figuras</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.1.</b> Anatomía del tracto reproductor de la cerda.....	35
<b>Figura 1.2.</b> Tasas de fecundación tras IA con semen fresco y congelado a diferentes momentos de inseminación con respecto a la ovulación (0h).....	43
<b>Figura 1.3.</b> Modelo de capacitación espermática.....	45
<b>Figura 5.1.</b> Distribution of times of ovulation in sows following injection of 600IU equine chorionic gonadotrophin at weaning and 5mg pLH at 80h after weaning.....	63
<b>Figura 6.1.</b> Effect of 10% boar seminal plasma on the proportion of uncapacitated, capacitated and acrosome-reacted frozen-thawed sperm.....	72
<b>Figura 7.1.</b> Porcentaje de cerdas y tiempo transcurrido desde la administración de hormona luteinizante porcina hasta la ovulación.....	79



## **Glosario de abreviaturas**

**AI:** Artificial insemination

**AC:** Adenil Ciclasa

**AMPc:** AMP cíclico

**ANOVA:** Analysis of variance

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ATP:** Adenosín trifosfato.

**BTS:** Beltsvillwe Thawing Solution

**BSA:** Bovine Serum Albumina / Albúmina sérica bovina

**°C:** Grados Celsius

**Ca:** Calcio

**CTC:** Chlortetracycline

**D:** Día(s)

**DE:** Desviación estándar

**DNA:** Desoxiribonucleic acid

**DPBS:** Dulbecco's PBS

**eCG:** Equine Chorionic Gonadotrophin / Gonadotropina Coriónica Equina

**FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations

**FS:** Fresh semen

**FT:** Frozen-thawed semen

**FSH:** Follicle-Stimulating Hormone / Hormona folículo-estimulante

**GnRH:** Gonadotrophin releasing hormone / Hormonas liberadora de gonadotropina

**H:** Hora(s)

**H1:** Histona 1

**hCG:** Human Chorionic Gonadotrophin/Gonadotropina Coriónica Humana

**HCO<sup>3-</sup>**: Bicarbonato

**IA**: Inseminación artificial

**ICO**: Intervalo celo-ovulación

**IDC**: Intervalo destete-celo

**IM**: Intramuscular

**IU**: International units / Unidades internacionales

**KG**: Kilogramo

**LH**: Luteinizing Hormone / Hormona Luteinizante

**LSD**: Least Significant Difference

**M**: Metro

**M1, M2, M3**: Momento 1, 2 y 3

**MEO**: Momento estimado de ovulación

**MHz**: Mega Hertzios

**MN**: Minnesota

**MI**: Michigan

**MIN**: Minutos

**mL**: Mililitro/milliliters

**mM**: Milimoles

**MPO**: Momento Previsto de Ovulación

**N**: Tamaño muestral

**Na**: Sodio

**ON**: Ontario

**P**: P-value

**P1**: Protamina 1

**PBS**:

**PGF2a**: Prostaglandina F2 $\alpha$ .

**PLCyL**: Fosfolipasas

**pLH:** Porcine Luteinizing Hormone / Hormona Luteinizante Porcina

**PMSG:** Pregnant Mare Serum Gonadotrophin / Gonadotropina sérica de yegua gestante

**PKC:** Proteína Kinasa C

**PKA:** Proteína Kinasa A

**PTO:** Predicted Time of Ovulation

**PRRS:** Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome

**PSP I, II:** Proteína del plasma seminal I y II

**R:** Coeficiente de correlación de Pearson

**ROS:** Radical libre de oxígeno

**RS:** Reservorio seminal

**RTU:** Real-time ultrasonography

**SAS:** Statistical analysis system

**SE:** Standard error

**SEM:** Standard Error Mean

**SP:** Seminal Plasma

**SR:** Sperm reservoir / Reservorio seminal

**TE:** Transferencia embrionaria

**UI:** Unidades Internacionales

**UTJ:** Uterotubal Junction / Unión útero-tubárica

**USA:** United States of America

**µm:** Micrómetro

**V/V:** Volumen/Volumen

**WEI:** Wean to estrus interval / Intervalo destete a celo

**WK:** Week(s)

**ZP:** Zona Pelúcida



# Resumen general

La presente tesis se compone de 3 publicaciones que describen un total de cinco experimentos desarrollados para evaluar el **establecimiento del reservorio espermático utero-tubárico**, así como los efectos de **la adición de plasma seminal y el momento de inseminación respecto a la ovulación** en la fertilidad y prolificidad obtenidas tras la inseminación artificial con semen congelado en la especie porcina.

En la primera publicación se describen dos experimentos realizados con el objetivo de determinar el número de espermatozoides localizados en el reservorio seminal en cerdas nulíparas tras la inseminación artificial con semen fresco, con semen congelado o con semen congelado suplementado con un 10% de plasma seminal. En el experimento uno, 35 cerdas nulíparas fueron inyectadas intramuscularmente con 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) más 200 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) para la inducción del estro. Tras la confirmación del celo, las cerdas fueron inseminadas con  $3 \times 10^9$  espermatozoides vivos, bien frescos (n=13), congelados (n=10) o congelados y suplementados con un 10% de plasma seminal (n=12). Las cerdas fueron sacrificadas 8h más tarde, sus tractos reproductivos recogidos y sus uniones uterotubáricas (UTJs) lavadas para recoger los espermatozoides. Se recogió una menor cantidad de espermatozoides después de la IA con semen congelado en comparación con semen fresco ( $p < 0.01$ ), no observándose efecto evidente tras la adición del plasma seminal. En el experimento dos, 30 cerdas nulíparas recibieron inyecciones intramusculares de 1000 UI de eCG seguidas de 5mg de hormona luteinizante porcina (pLH) 80h más tarde para controlar el momento de la ovulación. 12h antes del momento estimado de ovulación, las cerdas fueron inseminadas con  $3 \times 10^9$  espermatozoides vivos frescos (n=6), congelados (n=15) o congelados y



suplementados con un 10% de plasma seminal (n=9). A las 8 horas más tarde, las cerdas fueron sacrificadas y sus UTJs diseccionadas para recoger los espermatozoides. Nuevamente la menor cantidad de espermatozoides se recogió después de la inseminación con semen congelado y no hubo efecto evidente del plasma seminal. Estos datos demuestran que el tamaño del reservorio seminal se ve marcadamente reducido en cerdas nulíparas inseminadas con semen congelado. Sin embargo, la ausencia de efecto del plasma seminal sugiere que o bien no tuvo efecto en el revertimiento de la criocapacitación o que tal revertimiento no impacta en la habilidad de creación del reservorio seminal *in vivo*.

En la segunda publicación se describen la validación de un protocolo hormonal de inseminación a tiempo fijo, y dos experimentos dirigidos a evaluar el impacto de tres variables que influyen en la fertilidad a parto de cerdas multíparas tras la inseminación artificial con semen congelado: la deposición más profunda de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino, la inseminación más próxima al momento de ovulación, y la adición de plasma seminal durante el proceso de descongelación.

La validación del protocolo hormonal dio un resultado altamente satisfactorio, con todas las cerdas ovulando entre las 35 y las 42 horas, y un 75.7% de los animales ovulando en un intervalo de 2h entre las 37 y las 39h.

Para el primero de los dos experimentos diseñados para evaluar la fertilidad *in vivo* se utilizaron 122 cerdas multíparas de genética Yorkshire a las que se inyectaron 600UI de eCG al destete seguido de 5mg de pLH 80horas más tarde para controlar el momento de la ovulación. El momento estimado de ovulación (MEO) fue de 38horas después de la inyección de pLH. Posteriormente, las cerdas fueron asignadas en base a parto para recibir bien una única IA de semen congelado 2 horas antes del MEO o 12h antes del MEO, o con

semen congelado suplementado con 10% de plasma seminal a las 12h antes del MEO. Las hembras control recibieron semen fresco a las 12h antes del MEO. Todas las dosis seminales fueron ajustadas a  $3 \times 10^9$  espermatozoides vivos y se depositaron intracervicalmente. El segundo experimento empleó 99 multíparas y fue una repetición del primero salvo que todas las inseminaciones con semen congelado fueron realizadas intrauterinamente.

En los dos experimentos las tasas de parto obtenidas fueron menores ( $p < 0.01$ ) en las cerdas que recibieron semen congelado, independientemente del momento de la inseminación y de la adición de plasma seminal. El tamaño de la camada tampoco se vio afectado por estas variables. El menor tamaño del reservorio seminal y el descenso de las tasas de fertilidad obtenidos después de la inseminación con semen congelado sugieren que los daños producidos en los espermatozoides durante la criopreservación van más allá de los meramente asociados a la criocapacitación.

La ausencia de efecto observada en los diferentes experimentos tras la inseminación artificial de semen congelado suplementado con un 10% de plasma seminal se aborda ampliamente en la tercera publicación, en la que además se realiza una revisión de la aplicación práctica del plasma seminal como aditivo para aumentar la fertilidad de la inseminación artificial con semen congelado en ganado porcino.

# 1. Introducción



En el futuro, uno de los aspectos que recordaremos de los años que actualmente vivimos es la importancia del consumo como motor de la economía. Durante el final del siglo XX y comienzo del XXI las principales economías europeas han pasado de una situación de continuadas subidas interanuales de consumo a una importante situación de crisis financiera que ha precipitado el nivel de consumo de manera altamente significativa (Excelpork Plus 2014). Este hecho, manifestado con diferente gravedad en las diferentes actividades económicas, también ha afectado a los sectores más primarios de la producción agraria, las denominadas “commodities”. En el caso del porcino, una de las carnes más consumidas por la población a nivel mundial, se puede observar una tendencia moderada a la baja desde el año 2007 hasta el actual 2009, si bien se prevé un aumento en su demanda debido al crecimiento exponencial de la población del planeta (Excelpork Plus 2014).

Según datos recogidos por la FAO, en los últimos 10 años la producción de carne porcina se ha incrementado de 73 a 94 millones de toneladas métricas, lo que representa más del 40% del total de carne consumida en el mundo. Además, la demanda de este producto crece proporcionalmente a la población del planeta, estando proyectado un incremento progresivo anual para alcanzar los 125 millones de toneladas métricas en el 2020 (Gerrits *et al.*, 2005).

Las nuevas biotecnologías y la mejora en las técnicas de producción son clave en la optimización de la producción de carne porcina. Importantes avances en genética, nutrición, reproducción y epidemiología han permitido a la industria producir más número de lechones y más sanos cada año.

Bajo el termino “biotecnología de la reproducción” se incluyen muy diversas técnicas como la inseminación artificial (IA), sincronización del ciclo estral, inducción del parto, transferencia embrionaria (TE), crioconservación de oocitos y embriones, sexaje espermático, producción de embriones in vitro o transferencia nuclear y microinyección de ADN (Niemman and Rath, 2001).

La IA fue la primera gran biotecnología introducida para mejorar la reproducción en los animales de granja (Foote, 2002). Aunque la técnica se desarrolló mas rápidamente en Europa, hoy en día la IA es una practica común en todas las regiones productoras de porcino, incluyendo los Estados Unidos, donde además se inseminan cada año de manera artificial más de 9 millones de vacas y toda la producción de pavo (mas de 300 millones) (Senger, 2003).

En España, el sector porcino sigue siendo una pieza clave de la producción agraria del país, representando el 39,3% del valor de la producción final ganadera. Además, con más de 41 millones de cerdos producidos anualmente, España es desde hace años uno de los principales actores del escenario porcino mundial (Excelpork Plus 20014).

El semen congelado de porcino tiene una vida fértil reducida, debido en parte al estado de pseudo-capacitación inducido por el enfriamiento. Se ha demostrado in vitro que esta criocapacitación puede revertirse mediante la exposición al plasma seminal (Vadnais *et al.*, 2005a). Del mismo modo, se ha descrito que la fertilidad de la hembra tras la inseminación artificial con semen descongelado porcino puede incrementarse con la deposición más profunda de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino

(Martinez *et al.*, 2001), inseminación más próxima al momento de ovulación (Soede *et al.*, 2000) y potencialmente mediante el revertimiento de la criocapacitación con el plasma seminal (Okazaki *et al.*, 2012).

La presente tesis profundiza en estos 3 factores críticos para la fertilidad y prolificidad obtenidas tras la inseminación artificial con semen descongelado en la especie porcina: **El establecimiento del reservorio espermático utero-tubárico, la recuperación de la decapacitación espermática mediante la adición de plasma seminal y el momento de inseminación respecto a la ovulación.**





## 2. Revisión bibliográfica



La inseminación artificial comprende la obtención de semen del macho, su extensión (dilución) para producir múltiples dosis seminales y la posterior deposición en la tracto reproductor de la hembra. En 1779, el italiano Lazaro Spallanzani llevó a cabo la primera IA en Milan. Usando espermatozoides de perro para cubrir a una perra en celo, obtuvo una camada de cachorros de las mismas características morfológicas que sus progenitores. Este evento, confirmado por Pietro Rossi en 1782, se considera el comienzo de la inseminación artificial en animales domésticos (Abad 2001).

El profesor Abad en su revisión de 2001 señala como la inseminación artificial de animales de renta fue introducida por primera vez por Smith en 1891 como alternativa para el control de la infertilidad. Fue poco después (1902) cuando Sand hipotizó la posibilidad de mejorar la reproducción de los animales domésticos por medio de esta técnica. Durante los siguientes 30 años los principales avances en esta materia provinieron de Rusia, donde en 1922 Ivanov desarrolló el primer diluyente para semen, y su discípulo Milanov, la primera vagina artificial para ovino. Ivanov inició la técnica de IA en porcino en 1907, y el procedimiento fue posteriormente introducido en los Estados Unidos, Japon y Europa Occidental.

La rápida incorporación de la IA en porcino fue debida al mejor aprovechamiento de las dosis seminales y al mayor acceso de los productores a las genéticas de alta calidad. La incorporación de IA fue rápida en Europa, especialmente durante la década de 1990 a 2000 (Gerrits *et al.* 2005), lo que ha conducido una tasa actual de uso en torno al 90% en la mayor parte de los países de este continente. Estados Unidos tardó más tiempo en adoptar

esta técnica (Weitze *et al.* 2000), alcanzando un uso del 15% en 1994 y apenas un 50% en 1999 (Buhr 2001). Recientemente, se ha estimado que el 70% de las cerdas de Norteamérica son cubiertas mediante IA (Rodriguez-Martinez *et al.* 2005).

Muchos y variados diluyentes han sido desarrollados con el objetivo de mantener la viabilidad de la célula espermática tras la colecta. Los primeros diluyentes para el semen de verraco fueron desarrollados en Rusia y se basaban en soluciones de glucosa con tartrato potásico de sodio o sulfato de sodio y peptona, manteniendo baja la concentración de electrolitos (Foote 2002). La temperatura recomendada de almacenamiento para el semen diluido de esta manera era de 7 a 12 grados Celsius. Una vez que los diluyentes a base de yema-fosfato, yema-citrato y base lactea fueron desarrollados para el semen de toro, se adaptaron también posteriormente para el semen de verraco (Polge 1956). Ito *et al.*, (1948) fueron el primer grupo que recomendó temperaturas de almacenamiento de 15 a 20 °C para semen refrigerado de porcino.

Si se conserva entre 15 y 17 °C, el semen porcino puede mantener su viabilidad hasta los 7 días post-recogida (Johnson 1998; Levis 2000). Sin embargo, la mayor parte de las inseminaciones que se realizan actualmente se llevan a cabo con semen de no más de 3 días de antigüedad post-recogida. Las ventajas de la IA sobre la monta natural son elevadas, incluyendo la accesibilidad de los productores a superiores genéticas, mayor control de la calidad seminal, reproducción y uniformidad en los animales, disminución del riesgo de accidentes en el manejo, la posibilidad de cruzar machos pesados con hembras pequeñas, la eliminación de la necesidad de aislamiento y testaje de nuevos machos, el descenso del coste de alimentación y alojamiento de machos, reducción del riesgo de transmisión de

enfermedades por introducción de nuevos machos, reducción de la carga de trabajo en la nave de cubrición. Por el contrario también existen desventajas, como la necesidad de una mejora en la gestión para implementar correctamente un programa de IA y, si se realizan las extracciones de los machos en granja, la necesidad de entrenar previamente los machos y rediseñar las instalaciones para la extracción y procesamiento de las dosis.

En porcino, alrededor del 99% de las inseminaciones artificiales se realizan con semen fresco (refrigerado) (Johnson *et al.*, 2000). Los diluyentes y los procedimientos de congelación de vacuno fueron inicialmente adaptados con ligeras modificaciones para su uso en porcino (una intensa revisión fue realizada por Johnson en 1998). El método más comúnmente aceptado en los inicios fue el método de congelación en pellet desarrollado en Japón y descrito por Nagase y Graham en 1964. En la actualidad existe la posibilidad de congelación en pajuelas, aunque el elevado precio y la reducción de las tasas de gestación y parto en comparación con el uso de semen “fresco” limita el uso del espermatozoide criopreservado a programas de genética muy específicos.

Hace alrededor de 50 años varios autores, incluyendo Wiggins *et al.* (1951), Polge (1956) y Dziuk y Henshaw (1958), recomendaron la deposición intracervical de un importante volumen de líquido (50-200ml) y elevado número de espermatozoides (de 5 a  $6 \times 10^9$ ) en cada dosis seminal para obtener los máximos niveles de fertilidad tras inseminación artificial. Pocas modificaciones han sido realizadas a este respecto desde entonces, ya que la práctica actual requiere la deposición en el cérvix de la cerda de alrededor de  $3 \times 10^9$  células espermáticas en un volumen total de 70-100ml por dosis (revisión completa fue realizada por Martínez *et al.*, en el 2001<sup>a</sup>).

## **Reservorio seminal utero-tubárico**

Los órganos reproductivos de la hembra porcina (*Sus scrofa*) se muestran en la figura 1.1. La vulva es la porción más externa y visible del tracto reproductivo y responde a niveles cíclicos de estrógeno mostrando un estado edematoso congestivo durante el período de proestro. La vulva se comunica con la vagina, en cuyo suelo se encuentra la apertura de la uretra, siendo importante que se evite en los procesos de inseminación artificial mediante la redirección dorsal de los catéteres. El cuello o cérvix se localiza inmediatamente craneal a la vagina, y su lumen contiene múltiples pliegues interdigitales que dificultan la colonización del útero por parte de bacterias y material extraño. El cérvix es el sitio de deposición del semen durante la monta natural e inseminación artificial tradicional y bajo la influencia de la progesterona durante la gestación, segrega un muco altamente viscoso que mantiene los conceptos aislados del tracto vaginal externo. El útero de la cerda consiste en un cuerpo de tamaño pequeño y dos largos cuernos uterinos (1m aprox). Los oviductos se extienden desde el final de cada cuerno uterino hacia el ovario. La unión del útero con cada oviducto se denomina unión uterotubárica (UTJ). Una vez que los espermatozoides atraviesan esta porción, permanecen retenidos en los primeros 2 cm del istmo oviductal, lugar funcional del reservorio seminal (SR). Los espermatozoides que se localizan en el reservorio seminal se encuentran mayoritariamente no capacitados y mantienen este estado bajo la influencia del medioambiente local hasta momentos previos a la ovulación. La función primaria de los ovarios es la de producir los gametos femeninos, pero también producen hormonas (principalmente estrógeno y progesterona, y también oxitocina, relaxina, inhibina y activina).

Una revisión completa y reciente del ciclo estral fue realizada por Kirkwood en 1999. En la especie porcina el ciclo estral consta de 21 días de duración, correspondiendo aproximadamente 16 de ellos a la fase luteínica y 5 a la fase folicular. Durante la fase luteínica los cuerpos luteos ováricos producen progesterona, que limita el desarrollo folicular en los ovarios hasta el estadio de folículo intermedio, previniendo así el establecimiento del estro. Sobre los días 14-16 de fase luteínica comienza la producción endometrial de prostaglandina F2a (PGF), causante de la regresión de los cuerpos lúteos, terminándose así la producción de progesterona.

Esta eliminación del bloqueo de la progesterona permite el reestablecimiento de los patrones rutinarios de secreción de las gonadotropinas pituitarias, hormona luteinizante (LH) y foliculo estimulante (FSH) que a su vez permiten el reestablecimiento del desarrollo folicular ovárico. Los foliculos ovaricos en desarrollo secretan estrógeno, que en última estancia es el responsable del comportamiento estral. En las cerdas multíparas, un intervalo destete-estro de 4 o 5 días equivale a la fase folicular del ciclo estral. Coincidiendo aproximadamente con el establecimiento del estro, el incremento de los niveles de estrógeno circulante conduce a la liberación del pico de LH, causante de una cascada de eventos dentro del folículo (incluyendo el cambio de producción de estrógeno a progesterona) que culmina alrededor de 40 horas más tarde con la ovulación.

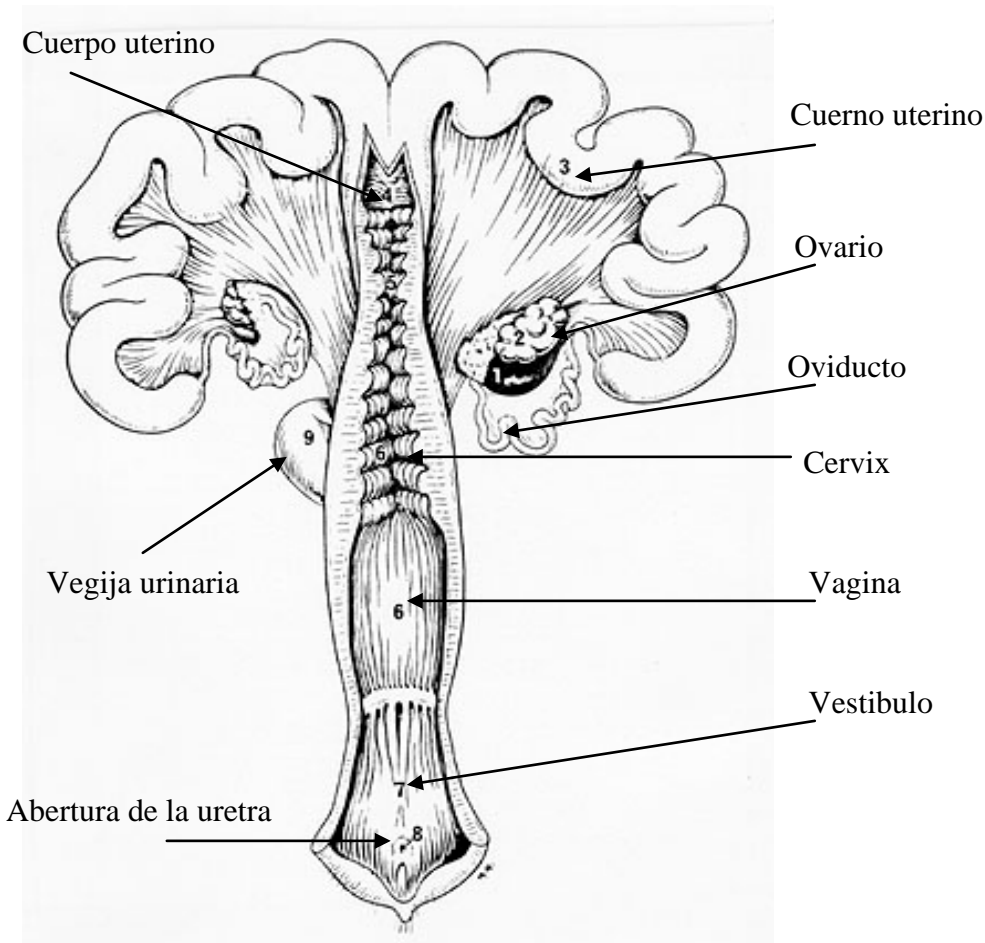
El sistema reproductor del macho consiste en testículos, epidídimo, glándulas sexuales accesorias, el cordón espermático y el pene. La función primaria de los testículos es la producción de los gametos masculinos (espermatozoides), pero también la síntesis de

hormonas como los andrógenos, estrógenos y la progesterona. El epidídimo es una estructura tubular que se encuentra a lo largo de los testículos y que sirve de almacén de los espermatozoides durante su maduración. Los vasos deferentes conectan cada epidídimo con la uretra. Las glándulas accesorias del verraco incluyen las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales, y estas glándulas segregan la porción protectora no-celular del semen conocida como plasma seminal.

La función testicular está controlada por la liberación pulsátil de GnRH del hipotálamo, que estimula la secreción de FSH y LH por parte de la pituitaria anterior. La LH estimula la producción de progesterona y testosterona por las células de Leydig mientras la FSH actúa en las células de Sertoli para aromatizar andrógeno a estrógeno y apoyar así la espermatogénesis. La inhibina, también producida por las células de Sertoli, regula la secreción de FSH mediante retroalimentación negativa.



**Figura 1.1** Anatomía del tracto reproductor de la cerda  
[http://www.wisc.edu/ansci\\_repro/lec/lec1/female\\_hist.html](http://www.wisc.edu/ansci_repro/lec/lec1/female_hist.html)



El eyaculado de verraco se compone de diversas fracciones, una inicial gelatinosa seguida de un pequeño volumen de fluido claro de origen prostático, que se continúa por la fracción rica espermática, más fluido claro prostático y finalizando con la mayor parte de la fracción gelatinosa. La fracción gelatinosa segregada por las glándulas bulbouretrales tiene un contenido alto en estrógeno. La mayor parte de los espermatozoides se localizan en la fracción rica del eyaculado. Tras la cópula, los espermatozoides empiezan a llegar al oviducto en 5-30 min (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005). El transporte uterino desde el cuerpo uterino a la unión uterotubárica se consigue mediante contracciones uterinas

coordinadas que resultan en la liberación de oxitocina y de PGF endometrial en respuesta al contenido estrogénico seminal (Willemburg *et al.*, 2004).

En la actualidad, las técnicas para la evaluación de la calidad del eyaculado de verraco son similares a las utilizadas en especie bovina (Johnson 1998). Existen diferencias entre razas y estacionales, pero generalmente el rango en el que oscilan los volúmenes del eyaculado porcino está entre 160 y 266 ml, con concentraciones de 374 a 548 millones de espermatozoides por ml (Ciereszko *et al.*, 2000). La motilidad espermática inmediatamente después de la colecta oscila entre el 70 y el 90% (Vyt *et al.* 2004). Para la inseminación artificial porcina, se recomienda un volumen mínimo de 50 ml con un número de espermatozoides móviles de  $3 \times 10^9$ . Aunque la inseminación de  $2 \times 10^9$  espermatozoides se ha visto efectiva (Watson y Behan 2002), actualmente las dosis estándares de IA contienen  $3 \times 10^9$  espermatozoides diluidos en 80ml de volumen total.

**Tabla 1.1.** Características de un eyaculado típico de verraco[Straw \(http://www.msu.edu/%7Estraw/\)](http://www.msu.edu/%7Estraw/)

Variable	Cantidad
Volumen total, ml	300
Volumen filtrado, ml	210
Volumen fracción gel, ml	90
Espermatozoides/ml semen filtrado	$200 \times 10^6$
Espermatozoides totales por eyaculado	$42 \times 10^9$
Espermatozoides móviles, %	70
Total de espermatozoides/eyaculado	$29.4 \times 10^9$
Dosis potenciales de IA	10

Con la deposición cervical, aproximadamente el 25-30% de las células espermáticas inseminadas y hasta el 70% del volumen se pierden por flujo retrógrado (Reflujo seminal; Steverink *et al.*, 1998). Aunque el reflujo seminal durante o inmediatamente después de la inseminación artificial ha preocupado desde los comienzos de esta técnica, evidencias recientes sugieren que su relación con la fertilidad es mínima. En 1998 Steverink y colaboradores inseminaron de  $1$  a  $6 \times 10^9$  espermatozoides diluidos en 80ml y recogieron el reflujo de semen que tenía lugar en 3 momentos: a) durante la IA; b) durante los primeros 30min después de la inseminación y c) desde los 30min hasta las 2.5h después de la inseminación. El 63% de las cerdas manifestó reflujo seminal durante la IA y el 98% mostró signos de reflujo después de la IA (Tabla 1.2). Sin embargo, sólo se observó una reducción de la fertilidad cuando elevados reflujos (>5% del número de espermatozoides

depositados) durante la inseminación de dosis seminales poco concentradas ( $1 \times 10^9$  espermatozoides). Presuntamente, bajo estas condiciones, el reflujo redujo el número de espermatozoides en el reservorio seminal (SR).

**Tabla 1.2.** Volumen y número de espermatozoides en el reflujo seminal durante IA (M1), 30 min post IA (M2) y 30min-2.5h post IA (M3). Las dosis seminales comprendían 80ml con 1, 3 o 6 x  $10^9$  espermatozoides

Reflujo	n % <sup>1</sup>	Volumen %		Espermatozoides %	
		Media $\pm$ de	Rango	Media $\pm$ de	Rango
M1	63.3	7 $\pm$ 1.1	1-56	8 $\pm$ 1.3	0.3 – 50
M2	98.2	31 $\pm$ 1.7	3-76	14 $\pm$ 1.0	0.3 – 79
M3	97.5	36 $\pm$ 2.6	1-94	9 $\pm$ 0.8	0.3 - 30

Fuente: Steverink *et al.* (1998)

<sup>1</sup> Porcentaje de cerdas exhibiendo reflujo

El tracto reproductor femenino es muy efectivo desplazando el espermatozoides fuera del plasma seminal o diluyente y ayudando a colonizar el oviducto. Consecuentemente, el reflujo durante los 30 min post IA, que fue observado en el 98% de las inseminaciones en el estudio de Steverink *et al.* (1998), va perdiendo concentración de espermatozoides por ml de fluido perdido a medida que transcurre el tiempo post inseminación. Sin embargo, en el reflujo que ocurre entre los 30min y las 2.5h después de la IA, no se observa efecto alguno en la fertilidad, independientemente del número de espermatozoides originalmente inseminados. Cuando tapones intracervicales fueron utilizados para prevenir el reflujo seminal, el número de espermatozoides en la porción útero-tubárica no se vieron aumentados (Pursel 1982).

Para lograr la fecundación, los espermatozoides deben alcanzar a los oocitos poco después de la ovulación. Con la IA convencional, los espermatozoides son depositados en el cervix y posteriormente transportados a lo largo del lumen uterino mediante contracciones miométricas. Los espermatozoides alcanzan la unión uterotubárica en aproximadamente 5 min (Rodríguez-Martínez et al. 2005), donde se crea un reservorio seminal funcional (Hunter 1981). Este reservorio sirve para proveer el apropiado número de espermatozoides en el momento y estado fisiológico idóneo, asegurando el éxito de la fecundación del mayor número de oocitos (Suárez 2002).

Los oviductos juegan un papel crucial en la modulación de la capacitación de los espermatozoides (Fazeli *et al.*, 1999; Petrunkina *et al.*, 2001; Hunter 2002) debido a los diferentes fluidos que pueden ser observados entre el istmo y la ampolla. Los espermatozoides no-capacitados se almacenan en el reservorio mediante uniones carbohidrato mediadas específicas a la superficie de la mucosa epitelial del oviducto (Suárez *et al.*, 1998). Bajos niveles de bicarbonato en la región del reservorio seminal oviductal actúan para retrasar o prevenir la capacitación antes de la liberación de espermatozoides en respuesta a señales ovulatorias.

Como ya describió el profesor Martínez en el año 2000, durante muchos años el oviducto ha sido considerado como un simple nexo de unión entre el útero y el ovario. Sin embargo, en la actualidad, cada día adquieren mayor importancia las funciones que en esta región se desarrollan (transporte, almacenamiento y capacitación espermática) y

que dan como resultado la unión del gameto masculino y el femenino y el posterior desarrollo embrionario (revisado por Rodríguez-Martínez, 1998).

El oviducto porcino se divide en tres porciones principales: el istmo, la ampolla y el infundíbulo. Conectando el final del cuerno uterino con el istmo se encuentra la unión útero-tubárica (UUT); el istmo se continúa con la ampolla, a través de la unión ampular-istmica. La morfología de la UUT ha sido descrita por microscopía electrónica (Flenchon y Hunter, 1981), habiéndose observado diferencias morfológicas y fisiológicas entre el lado uterino y el tubárico de dicha unión.

El propósito primario del transporte espermático es el establecimiento de una población de espermatozoides competentes en el lugar de la fecundación o cerca de él, en el momento de la ovulación, de tal forma que la penetración y activación del ovocito secundario pueda ocurrir antes de que comience el envejecimiento del ovocito (Hunter, 1980). El transporte de los espermatozoides porcinos en el tracto genital de la hembra, se divide tradicionalmente en tres fases: un transporte rápido a través de los cuernos uterinos, la invasión de los espermatozoides del reservorio espermático en la UUT y su liberación paulatina hacia el lugar de la fecundación, relacionada con la ovulación.

Al menos son tres las funciones que se han atribuido al reservorio espermático (Rodríguez-Martínez, 1998): la prevención de la polispermia, por el acusado descenso de espermatozoides a lo largo del tubo; el mantenimiento de la viabilidad espermática y de la capacidad fecundante y la modulación del proceso de la capacitación.

La característica fundamental de esta región del istmo, antes de la ovulación, es la secreción viscosa de mucus, que favorece el arresto preovulatorio de los

espermatozoides y puede también prevenir el paso de fluidos uterinos incluyendo a la suspensión de polimorfonucleares dentro del tubo. Otros factores, tales como la unión de los espermatozoides al epitelio (Suárez *et al.*, 1991) y una reducida temperatura, en esta porción antes de la ovulación (Hunter y Nichol, 1986), pueden contribuir al almacenamiento espermático en esta región. El arresto de espermatozoides, en esta región, es extremadamente efectivo antes de la ovulación, ya que con repetidas cubriciones no se consigue desplazar un mayor número de espermatozoides hacia el lugar de la fecundación (Hunter, 1984).

Momentos antes de la ovulación (1-2 horas), la secreción mucosa del reservorio cambia en viscosidad, coincidiendo con la liberación progresiva, en número muy controlado, de los espermatozoides y su desplazamiento desde el reservorio hacia la región ampular-istmica (Hunter *et al.*, 1983). Esto implica una reducción del número de espermatozoides, por lo que se previene la polispermia (Mburu *et al.*, 1997). Este fenómeno de liberación espermática controlada se encuentra bajo control endocrino del ovario (Hunter, 1988).

Durante la IA o la cubrición, miles de millones de espermatozoides se depositan en el útero. Sin embargo, tan sólo 100.000 ó 200.000 colonizan la UUT (1-2 horas post-deposición), unos cuantos miles alcanzan el reservorio espermático y, únicamente, varios centenares llegan al lugar de la fecundación (Hunter, 1981). Los espermatozoides que no alcanzan el reservorio a tiempo son destruidos por el ambiente hostil del útero, principalmente por la fagocitosis local de los leucocitos polimorfonucleares, hecho observado dentro de las 2 horas post-inseminación (Pursel *et al.*, 1978).

## **Momento de inseminación respecto a la ovulación**

Actualmente, una dosis estándar de inseminación artificial en porcino comprende  $3 \times 10^9$  espermatozoides diluidos en un volumen total de 80-90ml que son depositados intracervicalmente. Sin embargo, el reflujo seminal rápidamente reduce la porción líquida de los inseminados. A los 75 min post IA pocos restos de diluyente o fluidos seminales pueden ser recuperados. El reflujo seminal puede ser minimizado mediante inseminación intra-uterina, pudiéndose aumentar el número de espermatozoides viables que alcanzan el reservorio seminal, permitiendo una inseminación con bajo número de espermatozoides. De hecho, se ha demostrado que para una óptima fertilidad, menos cantidad de espermatozoides son progresivamente requeridos a medida que éstos son depositados más cerca de la unión uterotubárica. Cuando los espermatozoides fueron depositados cerca de la unión uterotubárica usando técnicas bien quirúrgicas (Krueger y Rath 2000) o endoscópicas (Vazquez *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2001<sup>a</sup>), se requiere un bajo número de espermatozoides (de 10 a  $150 \times 10^6$ ). Dichas técnicas de IA intrauterina solamente estarían justificadas cuando se estuviera trabajando con espermatozoides de elevado valor genético, o con espermatozoides de sexo preseleccionado. Sin embargo, el efecto del lugar de deposición ha recibido menor atención que otros parámetros relacionados con la fertilidad, como el empleo de diferentes aditivos en las dosis seminales, el efecto del plasma seminal en el transporte seminal, o el momento de inseminación relativo a la ovulación (Martinez *et al.* 2001b).



Recientemente, diversas compañías comerciales han desarrollado catéteres de IA que son capaces de sobrepasar con una leve manipulación manual el cervix de la cerda y permitir así la deposición de la dosis seminal en el interior del cuerpo uterino. El uso de esta técnica permite que la dosis de inseminación se pueda reducir a  $1 \times 10^9$  espermatozoides por inseminación (Watson y Behan 2002). Estudios clínicos de campo confirmaron estadísticamente que este uso de la inseminación intrauterina puede mantener las tasas de concepción alcanzables con las de IA standard, si bien es cierto que puede haber una reducción en el tamaño de la camada (Watson y Behan 2002; Rozeboom *et al.*, 2004). Es más, es probable que el momento de inseminación relativo a la ovulación sea más importante a medida que el número de espermatozoides depositados sea menor.

El momento de inseminación con relación a la ovulación es importante para la fertilidad de la cerda (Kemp y Soede 1996). Inseminaciones llevadas a cabo fuera de un tramo de tiempo desde las 24h hasta las 4h después de la ovulación resultaron en una reducción de la fertilidad tanto a través de la disminución de las tasas de parto como de los tamaños de la camada (Waberski *et al.*, 1994<sup>a,b</sup>; Nissen *et al.*, 1997). Actualmente, no existen métodos prácticos para la detección de la ovulación en grandes grupos de cerdas. Consecuentemente, el momento de inseminación se basa en la detección del estro, aunque es bien sabido que el momento de ovulación respecto al de detección del estro varía considerablemente.

El destete en grupo sirve como una herramienta efectiva de sincronización del estro ya que aproximadamente el 95% de las cerdas expresan estro entre los 3 y los 8 días post destete (Knox y Rodriguez-Zas 2001). La duración del estro se estima en una media de 40

horas para cerdas nulíparas y 48 horas para cerdas multíparas (Steverink *et al.*, 1997), pero el rango de horas es amplio (12-88h) dependiendo del parto, temporada, intervalo destete-estro y manejo en granja (Soede *et al.*, 2000). Se ha observado que la ovulación ocurre aproximadamente alrededor del 70% del período de duración del estro independientemente del total de horas que éste dure. El momento exacto con respecto a la ovulación es variable (de 10 a 85 horas; Weitze *et al.*, 1994; Nissen *et al.*, 1997).

Aunque el establecimiento del estro es el parámetro usado en la práctica comercial para determinar el momento de IA en porcino, es evidente que no es un buen predictor del momento de la ovulación.

Como consecuencia de la variabilidad de los intervalos estro-ovulación, suelen realizarse múltiples inseminaciones en cada ciclo reproductivo con el objeto de asegurar la deposición de los espermatozoides en el momento óptimo de fertilidad. Sin embargo, desde que estudios clínicos han mostrado que la IA causa una reacción inflamatoria en el útero perjudicial para la fertilidad de la cerda (Rozeboom *et al.*, 1998; Kaoket *et al.*, 2003), no se recomiendan inseminaciones demasiado frecuentes en un mismo ciclo estral. Prácticas comerciales comunes de inseminación con respecto al momento de detección del estro se describen en la tabla 1.3, en aquellas hembras en las que se observe una respuesta positiva al test de presión dorsal en el día 3 de estro también se recomienda su cubrición.

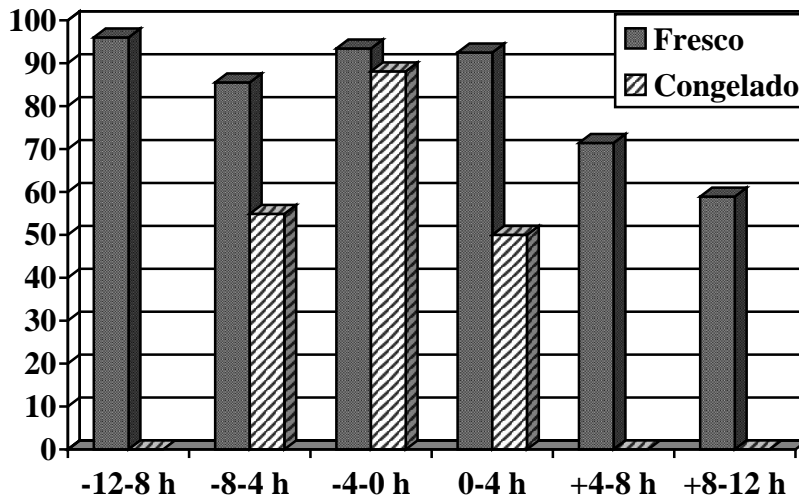
**Tabla 1.3.** Momento óptimo de inseminación relativo al momento de primera detección de estro (presión dorsal)

Frecuencia de detección del estro	Momento óptimo de inseminación	
	Nuliparas	Múltiparas
Una vez al día	0 y 24 horas	0 y 24 horas
Dos veces al día (separadas 12 horas)	12 y 24 horas	24 y 36 horas

Fuente: Estienne *et al.*, 2005

Actualmente, la fertilidad óptima se obtiene cuando las inseminaciones con semen “fresco” son realizadas durante las 24 horas anteriores a la ovulación, siendo el pico de fertilidad a las 12 horas pre ovulación (Waberski *et al.*, 1994<sup>a</sup>; Kem y Soede 1996). Cuando se utiliza semen congelado, las tasas de fertilidad son considerablemente inferiores. Sin embargo, Waberski *et al.* en 1994 realizaron inseminaciones con semen congelado en las 4 horas posteriores a la ovulación y obtuvieron tasas de fertilidad semejantes a aquellas obtenidas con semen “fresco” (figura 1.2)

Si supiéramos con exactitud el momento de ovulación, se podría utilizar una única inseminación artificial, o posiblemente aumentar el uso de semen congelado. Sin embargo, para obtener este grado de predictabilidad de la ovulación se requiere un control estricto del desarrollo folicular y del fenómeno de la ovulación, solamente alcanzable en la actualidad con el uso de hormonas exógenas.



**Figura 1.2.** Tasas de fecundación de IA con semen fresco y congelado a diferentes momentos de inseminación con respecto a la ovulación (0h). Fuente: Waberski *et al.*, 1994b

Diversas hormonas, como la gonadotropina coriónica humana (hCG), la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o la hormona luteinizante porcina (pLH) han sido utilizadas para controlar el fenómeno de la ovulación en porcino (De Rensis *et al.*, 2003; Cassar *et al.*, 2004; 2005). Aunque igualmente eficientes para la inducción de la ovulación, la diferencia entre los protocolos radica en la duración del intervalo inyección-ovulación, posiblemente la sincronía de la ovulación en los animales receptores. Clásicamente la hCG se creía que causaba una sincronización muy marcada en torno a las 40-42 horas post inyección (Tabla 1.4). Sin embargo, estudios recientes han revelado una relativa amplia variación en el intervalo inyección-ovulación (Soede *et al.*, 1998; Nissen *et al.*, 2000). Cuando la ovulación se indujo usando GnRH o pLH, el intervalo desde la inyección a la ovulación fue menor (36 a 38h) y el grado de sincronía de las cerdas administradas mayor (Cassar *et al.*, 2005). La fertilidad de la cerda tras inseminación artificial a tiempo fijo fue

mejorada (Candini *et al.*, 2001; De Rensis *et al.*, 2005; Cassar *et al.*, 2004, 2005) incluso cuando se emplearon inseminaciones únicas (Cassar *et al.*, 2005).

**Tabla 1.4.** Protocolos de sincronización hormonal basados en la administración de hCG

<b>Protocolo de sincronización</b>	<b>Ovulación (h)</b>	<b>Fuente</b>
750 IU hCG 68h post-destete	43	Soede <i>et al.</i> , 1998
1250 IU eCG 24h post-destete + 750 IU hCG 72h después	40-42	Martinez <i>et al.</i> , 2001a,b
750 IU hCG 96h post-destete	38-48	Nissen <i>et al.</i> , 2000
750 IU hCG 76h post-destete	40	Nissen <i>et al.</i> , 1995
PG600 + 500IU hCG 72h después	42	Bertani <i>et al.</i> , 1997

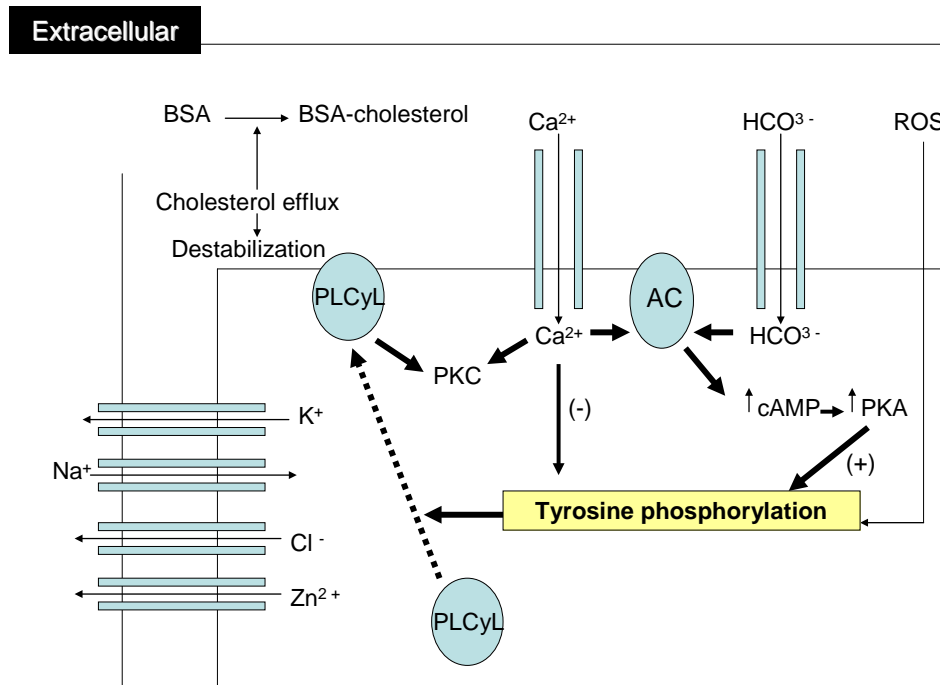
### **Recuperación de la decapitación espermática**

Los espermatozoides de los mamíferos no son capaces de fertilizar los huevos inmediatamente después de ser eyaculados. Adquieren la capacidad fertilizante después de residir en el tracto femenino durante un determinado período de tiempo, durante el cual diversos cambios biológicos ocurren que vuelven a las células espermáticas capaces de unirse al oocito y fertilizarlo (Visconti *et al.*, 2002). Los cambios fisiológicos que el espermatozoide lleva a cabo colectivamente son denominados “capacitación” (Yanagimachi 1994). Las células espermáticas capacitadas muestran una serie de propiedades que incluyen la falta de unión al epitelio oviductal del reservorio seminal, penetración de las capas de cumulus alrededor del oocito y unión a la zona pelúcida (ZP) que permite la reacción acrosomal (Fazeli *et al.*, 1999; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2005).

Durante la capacitación, varias proteínas derivadas de la cola del epidídimo y del plasma seminal son eliminadas de la superficie del espermatozoide, volviéndose accesible a las uniones lipídicas de los componentes de los fluidos de la luz oviductal que extraen colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide. En este estado, la fluidez de la membrana se ve incrementada, causando una desestructuración lipídica e iniciando ulteriores cambios en la capacitación como la toma de Calcio extracelular  $Ca^{2+}$ , fosforilación de la tirosina (Tardif *et al.*, 2001: 2003), y reorganización de la membrana espermática (Opfer\_Petersen *et al.*, 2000). En el cerdo, el bicarbonato parece ser la molécula que inicia el desordenamiento de la membrana, que se considera uno de los primeros signos de capacitación (Harrison *et al.*, 1996; Gadella y Harrison 2000). El bicarbonato está virtualmente ausente de los fluidos del epidídimo (0.5mM) mientras en los oviductos se detectan altas concentraciones (20mM), exceptuando la región del reservorio seminal (Suarez *et al.*, 1998). Estas modificaciones de la fluidez de la membrana preceden cambios específicos en el movimiento de Calcio y en los patrones de movilidad (ej. Motilidad hiperactivada) que predisponen a la reacción acrosomal y penetración de la ZP (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2005).

In vitro, se ha llevado a cabo el fenómeno de la capacitación usando células espermáticas incubadas bajo variedad de condiciones en medio definido (Breitbart *et al.*, 1997; Visconti y Kopf 1998; Baldi *et al.*, 2000; 2002). Se ha sugerido que durante la capacitación el pH intracelular y los niveles de Calcio aumentan, lo que activa la adenilato ciclasa resultando en un aumento en los niveles de AMP cíclico, y proteínas específicas (incluyendo ciclasas reguladas por señal extracelular) son posteriormente tirosino fosforiladas (Tardif *et al.*, 2003; De Lamirande 1997). Aunque la base molecular de la

capacitación todavía no está bien definida, el siguiente modelo propuesto por Baldi en 1996 (figura 1.3) se encuentra actualmente entre los más aceptados:



**Figura 1.3.** Modelo de capacitación espermática. La eliminación del colesterol de la membrana celular (acelerada por la presencia de albúmina sérica bovina (BSA) en el medio) aumenta la fluidez a los iones, incluyendo bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Ambos iones activan la adenil ciclasa (AC) en el interior de la célula, elevando los niveles de AMP cíclico (cAMP) y subsecuentemente activando la proteína kinasa A (PKA). PKA y las especies reactivas al oxígeno (ROS) previamente incorporadas incrementan la fosforilación de tirosina, que a su vez activan las fosfolipasas (PLCyL), que desestabilizan la estructura celular, remodelando los fosfolípidos de la membrana espermática. Una posible activación de la proteína kinasa C (PKC) también ha sido reportada (Baldi *et al.*, 1996).

Los primeros intentos de congelar semen porcino fueron descritos por Polge en 1956. Tras sucesivos fracasos tanto con inseminaciones cervicales como intrauterinas profundas, Polge y colaboradores en 1970 fueron el primer grupo que consiguió progenie a

partir de semen congelado mediante deposición quirúrgica del semen congelado directamente en el oviducto. Un año más tarde, usando el mismo método de criopreservación, otros 3 grupos (Crabo y Einarsson 1971; Graham *et al.*, 1971; Pursel y Johnson 1971) obtuvieron idéntico éxito (para revisión ver Peláez 2004). A partir de estos estudios iniciales se realizaron esfuerzos dirigidos a mejorar los procedimientos según se fueron descubriendo los potenciales beneficios del semen congelado para la industria porcina. Estas ventajas, revisadas en profundidad por Eriksson en el 2000, incluyen la posibilidad de almacenar el semen hasta completar cualquier test sanitario, permitiendo al semen se mantenido en cuarentena antes de ser introducido en la explotación. Del mismo modo, líneas genéticas específicas pueden ser preservadas y usadas en programas reproductivos futuros. Igualmente, genéticas mejoradas de cualquier origen del mundo podrían ser introducidas, eliminando las limitaciones geográficas actuales. El semen congelado permitiría planear cada cubrición, paso esencial en la cumbre de la pirámide reproductiva para el progreso óptimo de toda gestación.

El semen congelado se emplea en menos del 1% de todas las inseminaciones que se realizan actualmente en el mundo (Johnson *et al.*, 2000). Las limitaciones para un uso más amplio han permanecido invariables a lo largo de los últimos años, basándose principalmente en la obtención de menor fertilidad (tasas de parto entre 40 y 70% y tamaños de camada de 7 a 10) comparadas con aquellas adquiridas con semen fresco (tasas de parto entre 75 y 90% y tamaños de camada entre 9 y 12). Existe una amplia variación entre machos individuales en el éxito a la hora de congelar entendido como viabilidad espermática in-vitro y fertilidad post-descongelación in-vivo (Holt 2000<sup>a</sup>; Eriksson 2000). Esto, añadido a la falta de consistentes métodos de laboratorio para la evaluación de la



calidad seminal genera una problemática incluso más amplia cuando se intenta relacionar la viabilidad in vitro con los resultados de fertilidad in-vivo (Selles 2001). El momento de inseminación relativo a la ovulación debe ser preciso, ya que la ventana óptima de fertilidad para el semen congelado parece ser sustancialmente menor que para el fresco (Waberski *et al.*, 1994b). Del mismo modo, los costes son más elevados al usar semen congelado, debido a los métodos laboratoriales más costosos y al mayor número de células espermáticas necesarias en cada dosis de IA ( $5 \times 10^9$ ) en comparación con el semen fresco ( $3 \times 10^9$ ).

Aunque el semen congelado ha estado comercialmente disponible desde 1975 (Johnson y Larksson 1985), se ha usado principalmente para exportaciones y transferir genes específicos dentro del mercado doméstico. Se han descrito algunos usos comerciales del semen congelado (Hofmo y Grevle 2000) aunque no se ha llegado a extender con la amplitud del semen fresco debido principalmente a las limitaciones económicas anteriormente citadas (Wagner y Thibier 2002).

La susceptibilidad de los espermatozoides a las bajas temperaturas fue descrita por primera vez por Milanov en 1934 (Parks 1997), quien observó la pérdida irreversible de motilidad en el esperma de vacuno tras enfriar rápidamente a temperaturas próximas a los 0 °C, evento que él denominó “cold shock”. El semen porcino difiere del semen de otras especies domésticas en que es producido en grandes volúmenes y en que las células espermáticas son particularmente sensibles al cold shock. La severidad del shock depende de la tasa de enfriamiento y de la temperatura final obtenida, siendo máximo a tasas de enfriamiento elevadas y temperaturas finales de 12 a 2 °C y mínimo a tasas de enfriamiento por debajo de los 10 °C/minuto y temperaturas por encima de los 4 °C (Pelaez 2004).

El éxito de la congelación de semen porcino depende del grado de entendimiento de los múltiples factores que influyen en la capacidad del espermatozoide de sobrevivir a la congelación-descongelación mientras mantiene su capacidad fecundante. Estos factores son tanto internos, como las diferencias innatas entre machos y eyaculados, como externas como la composición de los diluyentes, el tipo y la concentración del agente crioprotector añadido, las tasas de dilución y enfriamiento, y el método de congelación-descongelación empleado (Johnson *et al.*, 2000). Solo los factores externos pueden ser modificados para optimizar los protocolos de congelación.

La criopreservación de semen requiere la dilución, crioprotección, enfriamiento, congelación, almacenamiento y descongelación, pasos que pueden llegar a causar un efecto perjudicial sobre la estructura y función celular del espermatozoide (Hammersted *et al.*, 1990). Inmediatamente después de la colecta, el semen es diluido en un medio apropiado, frecuentemente a base de yema de huevo o leche, a temperaturas próximas a la del cuerpo humano (de 30 a 39°C; Bailey *et al.*, 2003). La tasa de dilución standard es de 1 a 1 v/v ya que tasas superiores de dilución reducen la función espermática, posiblemente debido a la reducción del contacto entre el espermatozoide y los componentes del plasma seminal (Garner *et al.*, 2001), el denominado “efecto dilución” (Mann y Lutwack-Mann 1981 citados en Maxwell y Johnson 1999).

En la mayoría de las especies animales domésticas, el enfriamiento de los espermatozoides de la temperatura corporal a la próxima a la congelación representa un stress crítico para la membrana plasmática que resulta en la reestructuración y

desestabilización de los componentes de membrana e influjo de calcio (Bailey *et al.*, 2003). La adición de un agente crioprotector aumenta tanto la viabilidad como la motilidad de los espermatozoides a la descongelación. El glicerol es el agente crioprotector de elección para los espermatozoides de la mayoría de las especies domésticas, y normalmente se añade a tasas inferiores al 3% después del enfriamiento del semen a 5°C (Holt 2000b). La eficacia del glicerol es parcialmente debida a su efecto osmótico que aumenta drásticamente la osmolalidad del medio, retardando la formación de hielo intracelular (Hammerstedt *et al.*, 1990). Los efectos osmóticos del glicerol son marcados, pero transitorios, y un cambio rápido en el volumen celular no parece ser perjudicial para la función espermática (Liu y Foote 1998). Es más, el glicerol actúa directamente sobre la membrana plasmática del espermatozoide, posiblemente reduciendo algunas de las transiciones de fase e incrementando la fluidez de la membrana durante el enfriamiento (Noiles *et al.*, 1995). Los 2 protocolos más contrastados de criopreservación para esperma porcino, ambos descritos en 1975, se basan bien en la congelación en pajuelas (Westendorf *et al.*, 1975) o en pellets (Pursel y Johnson 1975), o en modificaciones a partir de estas técnicas.

El enfriamiento del semen a 4 C, paso inherente en los protocolos estándar de congelación, causa cambios moleculares a los espermatozoides que mimetizan eficazmente la capacitación (Bailey *et al.*, 2003). Esta reacción de pseudo-capacitación, o criocapacitación, no ocurre en la totalidad de la población espermática. Los espermatozoides porcinos suplementados con heparina, un agente capacitador consolidado para los espermatozoides de toro (Parrish *et al.*, 1998), penetraron casi dos veces más oocitos que los libres de heparina (Bailey *et al.*, 2000). Es más, estos autores suministraron evidencias de que tanto el proceso de enfriamiento como el propio de congelación

indujeron una capacitación precoz del semen de toro. Hallazgos similares fueron descritos en espermatozoides porcinos por Gillan y colaboradores en 1997. La manifestación del efecto de la pseudo-capacitación en la mayor parte de la población espermática después del enfriamiento entre 22 y 5 C indica que las transiciones de fase de los lípidos de membrana ocurren entre estas temperaturas en los espermatozoides porcinos (Green y Watson 2001).

Es sabido que la capacitación requiere una membrana espermática desestabilizada (Harrison 1997), lo cual debemos por ello asumir como verídico también para la criocapacitación. En este estado la membrana espermática es frágil y susceptible de deteriorarse o producir reacciones acrosomales espontáneas y muerte celular si la fecundación no se lleva a cabo. Por ello, la vida fértil in-vivo del semen congelado es reducida y la fertilidad de las dosis de IA está comprometida, debido a la proporción de espermatozoides cricapitados presentes (Bailey *et al.*, 2000).

El plasma seminal es la mayor parte del eyaculado de un verraco y juega un rol crítico en el transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductivo femenino. Producido por las glándulas accesorias del sistema reproductor masculino, el plasma seminal nutre los espermatozoides e interviene en los procesos de capacitación y fecundación (Zhu 2000).

La composición del plasma seminal varía entre especies, intervalo entre eyaculaciones, y la salud del animal (Maxwell y Johnson, 1999). El plasma seminal es especialmente rico en proteínas, cada una de las cuales puede desempeñar un rol diferente en las diferentes etapas del proceso de fecundación. Las espermadesinas son la familia

predominante de las proteínas del plasma seminal del verraco, y suman el 90% del total de proteínas en el plasma seminal (Calvete *et al.*, 1997). Diversos estudios de este autor han reportado que las proteínas Una (PSP-I) y Dos (PSP-II) del plasma seminal porcino, son los miembros principales de la familia de las espermadesinas, y representan ampliamente el 50% del total de proteínas en el plasma seminal (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005). Se suelen encontrar combinadas con heterodímeros que muestra una marcada actividad de unión glicoproteica con la zona pelúcida, lo cual sugiere un rol importante durante la interacción gamética (Zhu 2000).

Las hormonas del plasma seminal están potencialmente asociadas con la función seminal. Las células de Leydig secretan grandes cantidades de estrógenos, que modulan la síntesis y secreción proteicas de la misma manera que posiblemente afecten al momento de ovulación (Claus 1990). Sin embargo, el rol del plasma seminal en el momento de ovulación permanece poco claro, ya que su adición pre-inseminación adelantó el momento de ovulación en algunos estudios (Waberski *et al.*, 1997) pero no en otros (Soede *et al.*, 1998).

### **Efecto del plasma seminal en la capacitación espermática y fertilidad**

La incubación de semen porcino en presencia de plasma seminal induce la resistencia al cold shock en comparación con el incubado en ausencia del plasma seminal (Pursel *et al.*, 1973). Por el contrario, a temperaturas próximas a la congelación la presencia del plasma seminal causó un efecto perjudicial en la motilidad espermática post-descongelación (Memon *et al.*, 1985). Por ello, los protocolos de congelación del semen porcino normalmente incluyen una fase de incubación de varias horas a temperatura

ambiente en presencia de plasma seminal antes de centrifugar para su eliminación previa a las etapas de enfriamiento y congelación. En porcino, se ha comprobado mediante tinción con clortetraclina que la incubación de semen tanto fresco como congelado en plasma seminal fue capaz de prevenir y revertir el fenómeno de la capacitación (Vadnais *et al.*, 2005 a,b). Aunque la adición de plasma seminal al diluyente post descongelación resultó en una disminución del porcentaje de espermatozoides capacitados, los efectos de la adición de plasma seminal en la criocapacitación son dependientes de la temperatura de la suspensión espermática y de la presencia o ausencia de yema de huevo en el diluyente post descongelación (Vadnais *et al.*, 2005b).

Rath y Nieman (1997) mostraron *in vitro* como la capacidad fecundante de espermatozoides congelados tras su extracción directa del epidídimo era mejor que la de espermatozoides congelados después de su eyaculación, lo que refleja la mayor fertilidad del semen porcino congelado en medio ausente de los factores de decapitación que el plasma seminal añade a los espermatozoides durante la eyaculación. Es más, la motilidad del semen congelado de morueco fue mejor tras la adición del plasma seminal, y se observaron menor número de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal en comparación con el grupo control (sin plasma seminal; Maxwell *et al.*, 1999). Aunque los espermatozoides de verraco son menos susceptibles que los de morueco al efecto dilución (Ashworth *et al.*, 1994), actualmente los niveles óptimos de plasma seminal en el diluyente para mejorar la motilidad espermática se encuentran en valores próximos al 10% (Maxwell y Johnson 1999). Concentraciones inferiores (5%) o superiores (20%) resultaron perjudiciales para la supervivencia e integridad de las membranas espermáticas Maxwell *et al.*, 1997).

Diversos autores han estudiado la fertilidad espermática tras la adición del plasma seminal en las dosis de IA, obteniendo resultados muy diversos (Maxwell y Johnson 1999; Bellin et al. 1998; Graham 1994). La variación obtenida entre especies e individuos podrían estar asociados a la presencia, ausencia o concentración crítica de ciertos componentes, probablemente de naturaleza proteica, en algunos plasmas seminales pero no en otros (Maxwell y Johnson 1999). De hecho, en toros, proteínas de unión a heparina son secretadas de manera dependiente a la concentración de testosterona. Es más, algunas proteínas del plasma seminal han sido asociadas a tasas de concepción más altas en ganado vacuno (Bellin *et al.*, 1998) y las concentraciones de estas proteínas en el plasma seminal sufren variaciones entre distintos machos.

Diferencias entre verracos fueron observadas también por Rozeboom *et al.* en 2000 en la respuesta del útero a la adición de plasma seminal durante IA. El plasma seminal de algunos machos podrían contener mayor cantidad del /los componente/s que estimulan la respuesta inmunitaria uterina. La totalidad de estos estudios apoyan la hipótesis de que el plasma seminal contiene sustancias beneficiosas para el establecimiento de la gestación. Sin embargo, permanece claro que tanto las sustancias como sus acciones deben ser estudiados con mayor profundidad antes de que sea posible su aplicación comercial.





### 3. Objetivos



El objetivo principal de la presente tesis fue evaluar los efectos de tres factores críticos que influyen en la fertilidad y prolificidad tras la inseminación artificial de semen descongelado porcino:

- a) El establecimiento del reservorio seminal utero-tubárico (artículos I y III)
- b) La decapitación espermática mediante la adición de plasma seminal (artículos I,II y III)
- c) El momento de inseminación con respecto a la ovulación (artículos II y III)



## 4. Artículo I

Reprod Dom Anim 42, 149-152 (2007); doi; 10.1111/j.1439-0531-2006.00744.x  
ISSN 0936-6768

**Efecto de la criopreservación espermática y de la adición de plasma seminal en el establecimiento del reservorio seminal en cerdas nulíparas**

**M Abad, DJ Sprecher, P Ross, RM Friendship and RN Kirkwood**



## Effect of Sperm Cryopreservation and Supplementing Semen Doses with Seminal Plasma on the Establishment of a Sperm Reservoir in Gilts

M Abad<sup>1</sup>, DJ Sprecher<sup>1</sup>, P Ross<sup>1</sup>, RM Friendship<sup>2</sup> and RN Kirkwood<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Large Animal Clinical Sciences, Michigan State University, East Lansing, USA; <sup>2</sup>Department of Population Medicine, University of Guelph, Canada

### Contents

Frozen-thawed (FT) boar sperm have a reduced fertile life, due in part to a capacitation-like status induced by cooling. Reversal of this cryocapacitation *in vitro* by exposure to boar seminal plasma (SP) has been demonstrated. The objective of these studies was to determine the effect of SP on the ability of FT sperm to create an oviductal sperm reservoir following artificial insemination (AI). In Experiment one, 35 pre-pubertal gilts were injected (IM) with 400 IU eCG plus 200 IU hCG to induce oestrus. At detection of oestrus, gilts were inseminated with  $3 \times 10^9$  live sperm, either fresh (FS;  $n = 13$ ), FT ( $n = 10$ ), or FT supplemented with 10% v/v SP ( $n = 12$ ). Gilts were killed 8 h later, their reproductive tracts recovered and the uterotubal junctions (UTJs) flushed to recover sperm. Fewer ( $p < 0.01$ ) sperm were recovered following FT, compared to FS, inseminations, and there was no evident effect of SP. In Experiment two, 30 pre-pubertal gilts received IM injections of 1000 IU eCG followed by 5 mg pLH 80 h later to control time of ovulation. Gilts were inseminated with  $3 \times 10^9$  live FS sperm ( $n = 6$ ), FT sperm ( $n = 15$ ) or FT sperm plus 10% SP ( $n = 9$ ) at 12 h before ovulation and then sacrificed 8 h later. The UTJs were dissected and flushed for sperm recovery. Fewest ( $p < 0.001$ ) sperm were recovered following FT insemination and there was no evident effect of SP. These data demonstrate that the size of the sperm reservoir is markedly reduced in gilts inseminated with FT sperm. However, the lack of effect of SP suggested that either it did not reverse cryocapacitation or that such a reversal does not impact the *in vivo* ability to create a sperm reservoir.

### Introduction

After deposition into the female reproductive tract, boar sperm are passively transported by gravity and uterine contractions to the tubal end of the uterine horns. Thereafter, the sperm are passively and actively (sperm motility) transported through the uterotubal junction (UTJ) into the oviduct (Langendijk et al. 2002). Only a small percentage of the inseminated cells get to the UTJ (Rodriguez-Martinez et al. 2005), where due to the narrower lumen of the region (Fazeli et al. 1999), binding of non-capacitated sperm cells to oviductal epithelial cells (Suarez 1998; Petrunkina et al. 2001), and the local oviductal fluid environment (Rodriguez-Martinez et al. 2005), a functional sperm reservoir is formed in the distal 1–2 cm of the isthmus (Hunter 2002). The sperm remain in this region until immediately prior to ovulation, at which time they are released in waves to redistribute towards the ampulla–isthmus junction for fertilization. Presumably, a sufficient number of viable sperm cells are needed in the sperm reservoir in the peri-ovulatory period to maximize fertility rates.

In pigs, artificial insemination (AI) with frozen-thawed semen results in reduced farrowing rates and litter sizes (Johnson et al. 2000) due to cryoinjury to sperm including the induction of a capacitation-like status of the sperm cells, so-called cryocapacitation (Bailey et al. 2003). Since capacitated cells are not stored in the sperm reservoir, to be able to fertilize ova cryopreserved sperm must presumably encounter oocytes soon after insemination. Therefore, greater accuracy in timing of the insemination relative to time of ovulation is likely needed when using frozen-thawed semen (Larsson 1976). Hormones such as eCG, GnRH, hCG or pLH and their combination can be used effectively to control the time of ovulation in pigs, which may be monitored by real time ultrasonography (Soede et al. 1994).

If the primary cryoinjury associated with reduced fertility is cryocapacitation, then reversal of cryocapacitation should enhance sperm fertility. It has recently been demonstrated that based on chlortetracycline staining patterns, exposure to seminal plasma will reverse cryocapacitation of boar sperm *in vitro* (Vadnais et al. 2005a,b). Further, it has been documented that addition of seminal plasma to cryopreserved ram semen improved subsequent ewe fertility (Maxwell et al. 1999). A beneficial effect of thawing cryopreserved boar sperm in seminal plasma on *in vivo* sperm longevity (Einarsson and Viring 1973) and gilt and sow fertility (Crabo and Einarsson 1971; Larsson 1976) has also been documented. However, we are not aware of any recent studies examining the effect of a relatively low (10%) content of seminal plasma in thawing diluents on *in vivo* fertility in pigs. The present experiments were designed to test the hypothesis that cryopreserved boar sperm are less able to form a sperm reservoir in the oviduct and that this relative inability would be reversed by prior exposure to seminal plasma.

### Materials and Methods

These studies were performed at Michigan State University Swine Facility and University of Guelph (Arkell) Research Station and were approved by the institutional Animal Care committees.

In Experiment one, 60 prepubertal Landrace x Yorkshire gilts ( $124.3 \pm 1.8$  kg) were housed in groups of approximately 10 and were allowed *ad libitum* access to a standard finisher ration. Gilts received an IM injection of 400 IU equine chorionic gonadotrophin (eCG) plus 200 IU human chorionic gonadotrophin (hCG) (PG600,

Intervet) to induce a synchronous onset of oestrus. From day 1 post-injection, gilts were exposed to a mature boar for 15 min daily to facilitate detection of oestrus. Only those gilts exhibiting standing oestrus on day 5 were selected for the study (35/60). Selected gilts were assigned by weight to receive a single insemination either of fresh semen ( $n = 13$ ), frozen-thawed (FT) semen ( $n = 10$ ), or FT semen supplemented with 10% v/v seminal plasma (SP) ( $n = 12$ ). The seminal plasma was pre-mixed in the thawing extender so allowing the thawed sperm immediate contact with seminal plasma constituents. Commercial semen from two boars was used in this study and both fresh and frozen doses contained  $3 \times 10^9$  live sperm with boars equally represented within treatment. All inseminations were cervical and were performed by the same personnel using conventional foam-tip catheters in the presence of a mature boar.

In Experiment two, 30 prepubertal Landrace  $\times$  Large White gilts ( $127.5 \pm 2.4$  kg) without previous boar contact were housed as groups of approximately 10 and fed *ad libitum* a standard dry sow ration. Following formation of groups (day 0), ovulation was induced by IM injection of 1000 IU equine chorionic gonadotrophin (eCG; Pregnecol, Bioniche Animal Health, Bellville, Ontario, Canada) followed by 5 mg porcine luteinizing hormone (pLH; Lutropin, Bioniche Animal Health) 80 h later. Ovulation was predicted to occur 38 h after pLH injection. Gilts were allowed 15 min exposure to a mature boar at 12 h intervals to facilitate detection of oestrus.

At 26 h after pLH injection (12 h before the predicted time of ovulation) gilts were assigned by weight to receive a single insemination of fresh semen ( $n = 6$ ), FT semen ( $n = 15$ ), or FT semen + 10% v/v seminal plasma ( $n = 9$ ). The FT semen group was over-represented because of an expectation of lower sperm recovery. The same personnel using foam-tip catheters in the presence of a mature boar performed all of the inseminations.

The boars supplying semen and seminal plasma for Experiment two were housed in the Ponsonby Research Facility, University of Guelph. All boars were 8–12 months of age and were routinely collected weekly using the gloved-hand method. Immediately after collection, entire filtered ejaculates were transported to the laboratory at 37°C and analysed for volume, motility and sperm concentration. The same pool of three boars was used to obtain both fresh and FT semen doses. Sperm cryopreservation employed the method of Pursel and Johnson (1975), as modified by Buhr (2001). The vitality of cryopreserved sperm at thawing was determined using Eosin-Nigrosin staining. All doses (fresh and FT) were extended in Beltsville Thawing Solution to a total volume of 80 ml and  $3 \times 10^9$  live sperm.

In Experiments one and two, seminal plasma (SP) was obtained after centrifugation ( $800 \times g$  for 10 min at 25°C) of a pool of semen derived from 5 and 10 Yorkshire boars, respectively, and was stored at  $-80^\circ\text{C}$  until needed. Thawing of SP was done in a 37°C water bath and semen doses that included the 10% v/v SP were incubated for 20–30 min at 39°C before insemination. This interval was chosen based on previous data

showing that reversal of cryocapacitation *in vitro* required at least 15 min (Vadnais et al. 2005b).

At 8 h after insemination, gilts were either subjected to commercial slaughter procedures (Experiment one) or euthanized by IV injection of 100 mg/kg pentobarbital (Experiment two), and their reproductive tracts recovered. Both UTJs, defined as the portion of the tract comprising the last 1 cm of the uterine horn and first 3 cm of oviduct, were dissected and clamped. For flushing of sperm from the UTJs, a blunted 18 g 12 mm needle was introduced into the oviduct and the UTJ's filled with 0.5 ml of Dulbecco's PBS. A gentle massage was performed for 1 min to detach sperm cells from the oviductal epithelium and the volume emptied into a 15 ml tube. This was repeated once and thereafter, two more flushings were performed by forcing 5 ml DPBS to pass through the UTJ lumen. An average total volume of 11 ml was recovered for each UTJ.

The recovered fluid was centrifuged at  $800 \times g$  for 10 min (25°C), and the supernatant discarded. The pellet was re-suspended to 0.5 ml and then frozen overnight ( $-20^\circ\text{C}$ ) to destroy any maternal cells. After thawing by submersion in a 37°C water bath, the tubes were gently agitated to re-suspend sperm and the number of cells counted using a hemacytometer. The average of two readings was recorded for each oviduct and the average from both oviducts was recorded. If sperm were evident on the slide but absent from the designated counting area, the gilts were given a nominal total sperm count of 500.

#### Statistical analysis

Data were analysed using INFOSTAT/E v2.0 (University of Cordoba, Argentina). Differences in mean numbers of recovered spermatozoa were tested using analysis of variance with LSD Fisher approximation. Body weight was used as a blocker in all analyses. Results are presented as mean  $\pm$  SEM and  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

#### Results

In both experiments, examination of gilt ovaries *post mortem* revealed that none had ovulated. The effect of semen type and supplemental SP in Experiment one are shown in Table 1. The insemination of FT sperm resulted in a significantly smaller sperm reservoir ( $p < 0.01$ ). There was no effect of SP on numbers of sperm recovered.

Table 1. Effect of freezing and supplementation with seminal plasma (SP) on number of sperm recovered from the oviduct and uterotubal junction (Experiment 1)

	AI group		
	Fresh	Frozen	Frozen + SP
n	13	10	12
Body weight (kg)	$125.2 \pm 2.7$	$123.2 \pm 2.9$	$124.2 \pm 3.9$
Sperm recovered ( $\times 10^3$ )*	$211.8 \pm 84.9$	$9.1 \pm 2.4$	$8.6 \pm 2.2$

\* $p < 0.01$ .



Table 2. Effect of freezing and supplementation with seminal plasma (SP) on number of sperm recovered from the oviduct and uterotubal junction (Experiment 2)

	AI group		
	Fresh	Frozen	Frozen + SP
n	6	15	9
Body weight (kg)	119.2 ± 5.3	126.1 ± 3.3	135.6 ± 3.9
Sperm recovered (×10 <sup>3</sup> )*	141.6 ± 22.9	19.3 ± 1.3	9.4 ± 1.0

\*p < 0.001.

The effect of semen type and of supplemental SP in Experiment two is shown in Table 2. The results were very similar to those of Experiment one, with the insemination of FT sperm resulting in a significantly smaller sperm reservoir (p < 0.001) and with sperm numbers unaffected by supplemental SP.

## Discussion

The absence of evidence of ovulation in the gilts was taken to indicate that we had achieved our objective, i.e., induction of oestrus followed by insemination and establishment of sperm reservoirs in the pre-ovulatory period. Regarding the establishment of the sperm reservoir, the numbers of sperm recovered following the fresh semen inseminations were of the same order of magnitude as that reported previously (Langendijk et al. 2002; Willenburg et al. 2003). Therefore, the numbers of sperm observed are likely sufficient for normal fertility, although the minimum number of sperm within the sperm reservoir at the time of ovulation necessary to maximize oocyte fertilization rates remains unknown. We are not aware of any recent studies examining establishment of a sperm reservoir subsequent to AI with cryopreserved semen. However, the present results clearly indicate that cryopreservation markedly reduces the ability of sperm to associate with the oviductal epithelium of the sperm reservoir. It is now accepted that only non-capacitated sperm reside in the sperm reservoir (Fazeli et al. 1999; Tienthai et al. 2004). Therefore, the capacitation-like reaction induced by cooling (Vadnais et al. 2005a,b) may explain the inability of cryopreserved sperm to enter the sperm reservoir. If it is accepted that a small sperm reservoir will compromise fertility, then this inability to form an adequate sperm reservoir may partly explain fertility depressions associated with insemination of cryopreserved sperm.

Interestingly, using chlortetracycline (CTC) staining, seminal plasma has been shown to prevent and/or reverse capacitation *in vitro* (Maxwell et al. 1999; Vadnais et al. 2005a,b). Others have demonstrated improved gilt and sow fertility when frozen sperm were thawed in seminal plasma (Crabo and Einarsson 1971; Einarsson et al. 1973; Larsson and Einarsson 1975). Also, thawing in seminal plasma increased sperm survival time *in vivo* (Einarsson et al. 1973; Einarsson and Viring 1973). Clearly, some component(s) of seminal plasma can affect the fertility of cryopreserved boar sperm. However, in the present study the addition of

10% v/v seminal plasma to cryopreserved semen at thawing had no effect on the establishment of the sperm reservoir *in vivo*. This may indicate that the effect of 10% seminal plasma observed with CTC staining *in vitro* is not biologically meaningful. However, we have shown by flow cytometry of sperm stained with merocyanine and yo-pro that seminal plasma did prevent further capacitation when cryopreserved sperm were incubated in a capacitation-supporting medium (unpublished data). Therefore, if it is accepted that seminal plasma will affect the capacitation status of cryopreserved sperm, the implication is that the failure of cryopreserved sperm to form an effective sperm reservoir involves aspects of cryoinjury in addition to cryocapacitation. In support of this suggestion, it has been shown that approximately 60% of cryopreserved sperm exhibit cryocapacitation on thawing, with about 40% appearing "normal". If these normal appearing sperm are indeed normal, a markedly larger number of sperm would be anticipated in the sperm reservoir.

From our data, we conclude that cryopreserved boar sperm did not form an effective sperm reservoir subsequent to insemination. Further, the apparent lack of effect of seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir suggests that aspects of cryoinjury in addition to the cryocapacitation effect are involved. Whether a greater seminal plasma inclusion level, as used by earlier workers, would alter the observed effect remains unknown.

## Acknowledgements

We gratefully acknowledge Ontario Pork, Michigan State University Foundation, and the University of Guelph-Ontario Ministry of Agriculture and Food Animal Research Program for financial support of these studies. We are indebted to Dr. Jose Cibelli for allowing access to his laboratory (experiment one) and to Glen Cassar, Christine Pelland and Arturo Ruiz for invaluable assistance in the performance of experiment two.

## References

- Bailey J, Morrier A, Cormier N, 2003: Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. *Can J Anim Sci* **83**, 393–401.
- Buhr M, 2001: Emerging Tools in Artificial Insemination. In: *Proceedings of London Swine Conference*, pp. 123–135.
- Crabo B, Einarsson S, 1971: Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta vet scand* **12**, 125–127.
- Einarsson S, Viring S, 1973: Distribution of frozen-thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different time intervals after insemination. *J Reprod Fertil* **32**, 117–120.
- Einarsson S, Swensson T, Viring S, 1973: A field trial on the fertility of deep-frozen boar spermatozoa. *Nord Vet Med* **25**, 372–376.
- Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt WV, 1999: Sperm-oviduct interaction: Induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod* **60**, 879–886.
- Hunter RHF, 2002: Vital aspects of fallopian tube physiology in pigs. *Reprod Domest Anim* **37**, 186–190.
- Johnson LA, Witze KF, Fiser P, Maxwell WMC, 2000: Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* **62**, 143–172.
- Langendijk P, Bouwman EG, Kidson A, Kirkwood RN, Soede NM, Kemp B, 2002: Role of myometrial activity in

- sperm transport through the genital tract and in fertilization in sows. *Reproduction* **123**, 683–690.
- Larsson K, 1976: Fertility of deep frozen boar spermatozoa at various intervals between insemination and induced ovulation. Influence of boars and thawing diluents. *Acta vet scand* **17**, 63–73.
- Larsson K, Einarsson S, 1975: Fertility and post-thawing characteristics of deep frozen boar spermatozoa. *Andrologia* **7**, 25–30.
- Maxwell WMC, Evans G, Mortimer ST, Gillian L, Gellatly ES, McPhie CA, 1999: Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* **11**, 123–126.
- Petrunkina AM, Gehlhaar R, Drommer W, Waberski D, Topfer-Petersen E, 2001: Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction* **121**, 889–896.
- Pursel VG, Johnson LA, 1975: Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* **40**, 99–102.
- Rodriguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vazquez JM, Martinez E, Roca J, Sanz L, Calvete JJ, 2005: Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology* **63**, 514–535.
- Suarez SS, 1998: The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol Reprod* **58**, 1105–1107.
- Soede NM, Helmond FA, Kemp B, 1994: Perioovulatory profiles of oestradiol, LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. *J Reprod Fertil* **101**, 633–641.
- Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H, 2004: Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim Reprod Sci* **80**, 131–146.
- Vadnais M, Kirkwood RN, Tempelman RJ, Sprecher DJ, Chou K, 2005a: Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Anim Reprod Sci* **87**, 121–32.
- Vadnais ML, Kirkwood RN, Sprecher DJ, Chou K, 2005b: Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasmas on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Anim Reprod Sci* **90**, 347–354.
- Willenburg KL, Miller GM, Rodriguez-Zas SL, Knox RV, 2003: Influence of hormone supplementation to extended semen on artificial insemination, uterine contractions, establishment of a sperm reservoir, and fertility in swine. *J Anim Sci* **81**, 821–829.

Submitted: 11.04.2006

Author's address (for correspondence): Dr. R Kirkwood, Department of Large Animal Clinical Sciences, Michigan State University, East Lansing, USA. E-mail: kirkwood@cvm.msu.edu

## 5. Artículo II

Reprod Dom Anim 42, 418-422 (2007); doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00801.x  
ISSN 0936-6768

**Efecto del intervalo inseminación-ovulación y la adición de plasma seminal en la fertilidad porcina tras la inseminación de semen criopreservado**

**M Abad, JC Garcia, DJ Sprecher, G Cassar, RM Friendship, MM Buhr and RN Kirkwood**



## Effect of Insemination–Ovulation Interval and Addition of Seminal Plasma on Sow Fertility to Insemination of Cryopreserved Sperm

M Abad<sup>1</sup>, JC Garcia<sup>1</sup>, DJ Sprecher<sup>1</sup>, G Cassar<sup>2</sup>, RM Friendship<sup>2</sup>, MM Buhr<sup>3</sup> and RN Kirkwood<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Large Animal Clinical Sciences, Michigan State University, East Lansing, MI, USA; <sup>2</sup>Department of Population Medicine, University of Guelph, Ontario, Canada and <sup>3</sup>Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Ontario, Canada

### Contents

In swine, the use of frozen-thawed (FT) sperm for artificial insemination (AI) is limited because of poor sow fertility, possibly associated with a post-thaw capacitation-like status resulting in fewer fully viable sperm. Sow fertility to AI with FT sperm may improve with deeper deposition of sperm within the female tract, insemination very close to ovulation, or reversal of cryocapacitation by seminal plasma (SP). We performed two experiments to examine these suggestions. In experiment 1, 122 multiparous Yorkshire sows received 600 IU equine chorionic gonadotrophin at weaning and 5 mg pLH 80 h later to control time of ovulation. The predicted time of ovulation (PTO) was 38 h after pLH injection. Thereafter, sows were assigned on the basis of parity to a single AI of FT sperm at 2 h before PTO, or at 12 h before PTO, or FT sperm supplemented with 10% SP at 12 h before PTO. Control sows received fresh semen at 12 h before PTO. All semen doses were adjusted to  $3 \times 10^9$  live cells and deposited into the cervix. Experiment 2 employed 99 multiparous crossbred sows and repeated the treatments of experiment 1 except that all FT inseminations were intrauterine. In both experiments, farrowing rates were lower ( $p < 0.01$ ) following FT inseminations with no effect of time of insemination or of supplemental SP. In experiment 1, litter size was smaller following FT insemination ( $p < 0.05$ ), but no effect on litter size was evident in experiment 2. Supplemental SP had no effect on litter size in either experiment. The lack of effect of either SP or timing of FT insemination on sow fertility suggests that the non-lethal sperm cryoinjury affecting fertility involves more than just cryocapacitation.

### Introduction

Artificial insemination (AI) is the technique of choice in the breeding of domestic animals (Verberckmoes et al. 2004). However, in contrast to AI in cattle, swine AI involves almost exclusively liquid semen collected within the previous 3–7 days. This use of semen within a short interval from collection limits the time available to test for pathogenic contamination and, as such, increases the risk of disease transmission. Indeed, liquid semen is known to be a vehicle for dissemination of pathogens including the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and porcine circovirus. In addition to improved flexibility in timing of matings and access to worldwide genetics (reviewed by Eriksson 2000), the cryopreservation of boar sperm would allow sufficient time to ensure absence of pathogens and so improve herd biosecurity.

The limited use of frozen-thawed (FT) sperm in swine is primarily because of the relatively poor farrowing rates and litter sizes associated with FT inseminations (Johnson et al. 2000). This poor performance results

from cryoinjury to sperm including the induction of a capacitation-like status of the sperm cells, so-called cryocapacitation (Bailey et al. 2003).

As cryocapacitated sperm cells are not stored in the oviductal sperm reservoir (Abad et al. 2006), their fertile lifespan will be very short. Therefore, for acceptable fertilization rates cryopreserved sperm must presumably encounter ova soon after insemination. Indeed, when inseminated very close to the time of ovulation (e.g.  $\leq 4$  h), fertility to FT inseminations was improved (Roca et al. 2003; Bolarin et al. 2006), with fertilization rates being comparable to those from inseminations of fresh semen (Waberski et al. 1994).

Potentially, a further way to improve fertility of FT sperm is to reverse cryocapacitation. Using chlortetracycline staining, it has been demonstrated that incubation of fresh or FT sperm in media supplemented with seminal plasma (SP) will reverse (cryo)capacitation (Suzuki et al. 2002; Vadnais et al. 2005a,b). Further, supplementing FT semen doses with SP has been shown to improve *in vivo* fertility of ewes (Maxwell et al. 1999) and mares (Alghamdi et al. 2005). A beneficial effect of thawing cryopreserved boar sperm in SP on *in vivo* sperm longevity (Einarsson and Viring 1973) and on gilt and sow fertility has also been documented (e.g. Crabo and Einarsson 1971; Einarsson et al. 1973). However, to our knowledge, sow fertility to insemination of FT sperm in a commercial extender supplemented with SP has not been examined. The present experiments were undertaken to test the hypothesis that supplementing FT sperm with SP will extend *in vivo* sperm longevity and so allow maintenance of sow fertility when insemination occurs 12 h before ovulation.

### Material and Methods

These studies were performed at the University of Guelph, Arkell Research Station (Experiment 1) and Michigan State University Swine Facility (Experiment 2). The respective institutional Animal Care committees approved the studies.

Prior to conducting the insemination studies, a pilot study was performed at the University of Guelph to verify the efficacy of a protocol described by Cassar et al. (2005) for hormonally controlling the time of ovulation. At weaning, 37 multiparous sows received an injection (IM) of 600 IU equine chorionic gonadotrophin (eCG; Pregnecol®, Bioniche Animal Health, Belleville, Ontario, Canada) to stimulate ovarian follicular development. At 80 h after the eCG, sows received



an injection (IM) of 5 mg porcine luteinizing hormone (pLH; Lutropin®, Bioniche Animal Health, Belleville, Ontario, Canada) to induce ovulation. Sows were subjected to transrectal real-time ultrasound examinations of the ovaries using an Aloka 500 with a 7.5 MHz linear array transducer every 2 h from 34 h after pLH injection until ovulation was complete. Ovulation time was defined as the time midway between an observed absence of ovulatory follicles (>6 mm) and the previous examination (Weitze et al. 1989).

For experiment 1, 122 multiparous purebred Yorkshire sows at the University of Guelph were assigned at weaning to control of oestrus and ovulation as described above. The predicted time of ovulation (PTO) was 38 h after pLH injection and oestrus detection was not employed prior to this time. Immediately before breeding, the sows were assigned by parity to insemination with: (i) fresh sperm 12 h before PTO; (ii) FT sperm 12 h before PTO; (iii) FT sperm supplemented with 10% (v/v) SP 12 h before PTO; and (iv) FT sperm 2 h before PTO. The 10% SP inclusion rate was chosen based on its demonstrated reversal of cryocapacitation *in vitro* (Vadnais et al. 2005b). Sows were bred in the presence of a boar, at which time oestrus behaviour was confirmed. The SP was obtained after centrifugation ( $800 \times g$  for 10 min at 25°C) of a pool of semen derived from 10 Yorkshire boars, and was stored at –20°C until needed. Thawing of SP was done in a 37°C water bath and the SP was added to extender prior to thawing sperm to allow immediate contact between the sperm and SP. Both fresh and FT sperm were obtained from the same pool of three boars housed at a commercial boar stud (Ontario Swine Improvement, Innerkip, Ontario, Canada). Sperm was cryopreserved in 0.5 ml straws by the method of Pursel and Johnson (1975) modified by Buhr (2001) to increase the rate of thaw by submersion for 5 s in a 60°C water bath. At thawing, the semen from the three boars was assessed for vitality and then pooled. The post-thaw vitality of sperm was determined using Eosin–Nigrosin staining. All doses (fresh and FT) were extended in Beltsville thawing solution to a total volume of 80 ml and  $3 \times 10^9$  live sperm and were deposited intracervically in the presence of a boar. Sows were allowed to go to term, and farrowing rates and subsequent litter sizes were recorded.

For experiment 2, 99 multiparous Yorkshire  $\times$  Landrace sows were assigned at weaning to the treatments as described for experiment 1, except that all FT inseminations were intrauterine. Ultrasound examinations of the ovaries were not performed in these sows, but a PTO of 38 h was assumed based on data from the pilot study and of Cassar et al. (2005) and oestrus detection was not performed prior to AI. Sows were bred in the presence of a boar at which time oestrus behaviour was recorded. The SP was obtained after centrifugation ( $800 \times g$  for 10 min at 25°C) of a pool of semen derived from five Yorkshire boars, and was stored at –20°C until needed. Thawing of SP was done in a 37°C water bath and the SP was added to extender prior to thawing sperm to allow immediate contact between the sperm and SP. The fresh and FT semen was obtained commercially (International Boar Semen, IA, USA) with boars equally represented among treatments. The FT semen in 5 ml

straws was thawed according to the suppliers protocol, which involved exposure to the room temperature for 7 s followed by submersion in 42°C water bath for 43 s. The post-thaw vitality of sperm was determined using Eosin–Nigrosin staining and doses (fresh and FT) were extended in X-cell® extender (IMV, Maple Grove, MN, USA) to a total volume of 80 ml and  $3 \times 10^9$  live sperm. Doses of FT were deposited using an intrauterine catheter (IMV, Maple Grove, MN, USA) while fresh semen was deposited intracervically. Sows were allowed to go to term and farrowing rates and subsequent litter sizes were recorded.

### Statistical analysis

Data were analysed using INFOSTAT/E v2.0 (University of Cordoba, Argentina). Differences in farrowing rates and litter sizes (total born) were tested using analysis of variance with Least Significant Difference Fisher approximation, and with parity as a covariable. Results are presented as mean  $\pm$  SEM and  $p < 0.05$  was considered significant.

### Results

The distribution of ovulation times in response to the injections of eCG and pLH is shown in Fig. 1. All sows ovulated between 35 and 42 h, with 75.7% of the animals ovulating in a 2 h interval between 37 and 39 h. The time of ovulation (mean  $\pm$  SEM) was  $38.4 \pm 0.3$  h after pLH injection.

In Experiment 1, a mean ( $\pm$ SEM) of  $34.1 \pm 6.1\%$  of the thawed sperm cells was observed to be alive in randomly selected semen samples. The effects of semen type, supplemental SP and time of AI relative to ovulation are shown in Table 1. The insemination of FT sperm resulted in reduced farrowing rates ( $p < 0.01$ ) and smaller litter sizes ( $p < 0.05$ ). There was no effect of supplemental SP on farrowing rate or litter size (Table 1).

In Experiment 2, a mean ( $\pm$ SEM) of  $65.4 \pm 2.7\%$  of the thawed sperm cells was observed to be alive in randomly selected semen samples. The effects of semen type, supplemental SP and time of AI relative to ovulation are shown in Table 2. The insemination of

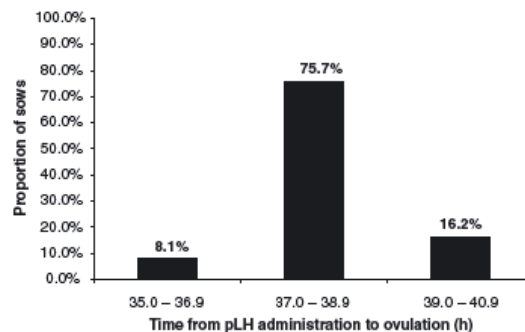


Fig. 1. Distribution of times of ovulation in sows following injection of 600 IU equine chorionic gonadotrophin at weaning and 5 mg pLH at 80 h after weaning

Table 1. Farrowing rates and total born litter sizes following artificial insemination of fresh sperm (FS) or frozen-thawed (FT) sperm with or without 10% supplemental seminal plasma (SP) inseminated 2 or 12 h before ovulation (experiment 1)<sup>a</sup>

	FS - 12 h	FT - 12 h	FT - 12 h + SP	FT - 2 h
Number of sows	32	26	30	34
Parity <sup>b</sup>	3.2 ± 0.3	3.3 ± 0.3	3.7 ± 0.4	3.0 ± 0.2
Farrowing rate (%)	68.8a	7.7b	10.0b	14.7b
Total born litter size <sup>b</sup>	12.1 ± 0.8c	5.0 ± 1.0e	3.3 ± 0.9e	8.0 ± 1.8d

<sup>a</sup>All inseminations were intracervical.

<sup>b</sup>Mean ± SEM.

Mean values followed by different letters differ; ab,  $p < 0.01$ ; cde,  $p < 0.05$ .

Table 2. Farrowing rates and total born litter sizes following artificial insemination of fresh sperm (FS) or frozen-thawed (FT) sperm with or without 10% supplemental seminal plasma (SP) inseminated 2 or 12 h before ovulation (experiment 2)<sup>a</sup>

	FS - 12 h	FT - 12 h	FT - 12 h + SP	FT - 2 h
Number of sows	25	24	24	26
Parity <sup>b</sup>	2.8 ± 0.3	2.7 ± 0.3	2.7 ± 0.3	3.0 ± 0.4
Farrowing rate (%)	92.0a	37.5b	41.7b	38.5b
Total born litter size <sup>b</sup>	10.3 ± 0.9	8.1 ± 1.3	9.4 ± 1.6	9.6 ± 1.4

<sup>a</sup>FS sperm was inseminated intracervically but all FT sperms were inseminated transcervically into the uterine body.

<sup>b</sup>Mean ± SEM.

Mean values followed by different letters differ; ab,  $p < 0.01$ .

FT sperm resulted in significantly reduced farrowing rates ( $p < 0.01$ ) but semen type did not affect litter size. There was no effect of supplemental SP on farrowing rate or litter size (Table 2).

## Discussion

Our data indicated an LH-to-ovulation interval of 38.4 h, which is very similar to the 38.2 h previously reported for gilts (Gama et al. 2005) and to data reported for sows; 37.3 h (Candini et al. 1999), 35.5 h (Candini et al. 2001) and 38.2 h (Cassar et al. (2005). Further, other workers have indicated a GnRH-to-ovulation interval of 38 h (Langendijk et al. 2000) and 33–34 h (Baer and Bilkei 2004). Taken together, the present data and that in the literature suggest that the ovulation control protocol described herein likely resulted in ovulation consistently at about 38 h after the pLH injection. Therefore, we are relatively confident that the targeted times of insemination relative to the time of ovulation were accurate, although some variation about the mean was expected. This is further supported by the 92% farrowing rate observed in experiment 2 following a single insemination of fresh semen on a farm with a historical average of about 70% farrowing rate.

In the present studies, insemination of FT sperm was associated with reduced farrowing rates regardless of site of sperm deposition or time of sperm deposition relative to predicted ovulation. There was a relatively large difference between experiments in the fertility to insemination of both fresh and FT sperm. Some of the poorer fertility in experiment 1 may be attributable to the use of purebred sows. However, the particularly poor fertility to insemination of FT sperm was

surprising as we adjusted insemination doses to provide  $3 \times 10^9$  live sperm per semen dose. As improved fertility can be expected with increasing numbers of functional sperm (Bolarin et al. 2006), the poor fertility to FT sperm in experiment 1 suggests that assessment of sperm vitality alone will not provide an acceptable evaluation of likely fertility.

Others have previously observed that fertilization rates following FT inseminations were comparable to those following insemination of fresh sperm, if the FT inseminations were performed within 4 h of spontaneous ovulation (Waberski et al. 1994). However, comparison with the present work is problematic because sow fertility beyond determination of fertilization rates was not measured. Although speculative, it is possible that an improved fertilization rate was realized in the present studies but that early pregnancy losses masked any effect. More recently, Wongtawan et al. (2006) observed that pregnancy rates in sows following deep intrauterine insemination of non-extended FT sperm were improved with closer timing of insemination relative to spontaneous ovulation with the optimal interval being 4–8 h before ovulation. However, using a model of spontaneous ovulation resulted in very few sows within any specified time period relative to ovulation. Indeed, it has been observed that using a model of spontaneous ovulation sow fertility to deep intrauterine FT insemination was less than that from fresh semen inseminations, but that they were statistically comparable when the FT inseminations occurred at 2–4 h before a hormonally controlled ovulation (Roca et al. 2003). However, the latter authors employed only  $150 \times 10^6$  fresh sperm and a greater distinction between fresh and FT insemination results may have been evident if a larger number of fresh sperm had been used. Alternatively, we may have observed an effect of timing of insemination if sperm deposition had been deeper. Although speculative, if this were the case it would implicate a problem with transport of FT sperm into the oviduct, as suggested by Holt (2000).

It has been suggested that the poor fertility associated with insemination of FT sperm involves the cooling-associated induction of a capacitation-like state (cryocapacitation), which would render the FT sperm incapable of forming an enduring oviductal sperm reservoir. That FT sperm do not appear to form an effective sperm reservoir has been documented (Abad et al. 2006; Wongtawan et al. 2006). Interestingly, therefore, although SP has been shown to reverse cryocapacitation, such exposure did not affect the ability of FT sperm to form a sperm reservoir (Abad et al. 2006). In addition to reversing cryocapacitation, SP has also been shown to modulate uterine immune responses to sperm (Rozeboom et al. 1998) and to be involved in the regulation of early embryo development (O'Leary et al. 2004). However, there were no effects of SP on litter size.

The lack of effect of SP observed in our studies suggests that either the supplemental SP did not affect the cryocapacitation, or more likely that cryopreservation caused sperm injuries in addition to cryocapacitation that adversely impacted fertility. Interestingly, others have shown that SP derived from different boars can have different effects on the viability of sperm of other boars,



with one source actually having a negative effect (Caballero et al. 2004). While a negative or null effect of the SPs used in these studies cannot be totally discounted, we did use two pools of SP derived from different boar populations and neither indicated a positive effect. What remains to be resolved is whether a higher concentration of SP would yield a different response.

From the data presented, we conclude that sow fertility to insemination of cryopreserved sperm is not improved by insemination close to the time of ovulation. However, some caution should be exercised as the individual times of ovulation were not determined in the main studies. It must be recognized that some sows may not respond to the treatment protocol, although our pilot study did indicate 100% response. Also, we inseminated relative to a predicted time of ovulation with no consideration of the likely distribution of actual times of ovulation. However, ovulation times relative to pLH injection would likely be relatively synchronous and we believe that our insemination at 2 h before PTO provided sufficient latitude to ensure that most sows were inseminated from 0 to 4 h before ovulation. Further, there was no benefit associated with supplementing semen doses with SP, suggesting that reduced fertility of FT sperm results from cryoinjury additional to cryocapacitation.

#### Acknowledgments

We gratefully acknowledge Ontario Pork, Michigan State University Animal Industry Coalition and the University of Guelph-Ontario Ministry of Agriculture and Food Animal Research Program for financial support of these studies.

#### References

- Abad M, Sprecher DJ, Ross P, Friendship RM, Kirkwood RN, 2007: Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. *Reprod Domest Anim* **42**, 149–152.
- Alghamdi AS, Madill S, Foster DN, 2005: Seminal plasma improves fertility of frozen equine semen. *Anim Reprod Sci* **89**, 242–245.
- Baer C, Bilkei G, 2004: The effect of intravaginal applied GnRH-agonist on the time of ovulation and subsequent reproductive performance of weaned multiparous sows. *Reprod Domest Anim* **39**, 293–297.
- Bailey J, Morrier A, Cormier N, 2003: Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Can J Anim Sci* **83**, 393–401.
- Bolarin A, Roca J, Rodriguez-Martinez H, Hernandez M, Vazquez JM, Martinez EA, 2006: Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. *Theriogenology* **65**, 669–680.
- Buhr M, 2001: Emerging tools in artificial insemination. Proc London Swine Conference, London, Ontario 2001, pp. 123–135.
- Caballero I, Vazquez JM, Centurion F, Rodriguez-Martinez H, Parrilla I, Roca J, Cuello C, Martinez EA, 2004: Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reprod Domest Anim* **39**, 370–375.
- Candini PH, Zanela E, Silveira PRS, Moretti AS, Viana CHC, Valentim R, 1999: Utilization of porcine LH on synchronization of ovulation in weaned sows. Proc Brazilian Cong Swine Vet Practitioners, Belo Horizonte, Brazil, 1999. **9**, 375–376.
- Candini PH, Moretti AS, Silveira PRS, Zanela E, Viana CHC, Santos ICC, 2001: Utilization of a protocol of synchronization of ovulation, induced by porcine LH, to perform insemination programs in fixed time, with one or two inseminations per sow. Proc 6th Int Conf Pig Reprod, Columbia-Missouri, 2001, 99.
- Cassar G, Kirkwood RN, Poljak Z, Bennett-Steward K, Friendship RM, 2005: Effect of single or double insemination on fertility of sows bred at an induced estrus and ovulation. *J Swine Health Prod* **13**, 254–258.
- Crabo B, Einarsson S, 1971: Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta vet scand* **12**, 125–127.
- Einarsson S, Viring S, 1973: Distribution of frozen-thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different time intervals after insemination. *J Reprod Fertil* **32**, 117–120.
- Einarsson S, Swensson T, Viring S, 1973: A field trial on the fertility of deep-frozen boar spermatozoa. *Nord Vet Med* **25**, 372–376.
- Eriksson B, 2000: Cryopreservation of boar semen. Studies on sperm viability in vitro and fertility. PhD Thesis. Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala, Sweden.
- Gama RD, Vianna WL, Pinese ME, de Campos Rosseto A, de Sant'Anna Moretti A, 2005: Different doses of porcine luteinizing hormone in precocious puberty induction in gilts. *Reprod Domest Anim* **40**, 433–435.
- Holt WV, 2000: Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* **53**, 47–58.
- Johnson LA, Witze KF, Fiser P, Maxwell WMC, 2000: Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* **62**, 143–172.
- Langendijk P, Bouwman E, Soede N, Kemp B, 2000: GnRH and hCG synchronise ovulation in sows without pretreatment with eCG. *J Reprod Fertil (abstr)*, series **26**, 35.
- Maxwell WMC, Evans G, Mortimer ST, Gillan L, Gellatly ES, McPhie CA, 1999: Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* **11**, 123–126.
- O'Leary S, Jasper MJ, Warnes GM, Armstrong DT, Robertson SA, 2004: Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction* **128**, 237–247.
- Pursel VG, Johnson LA, 1975: Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* **40**, 99–102.
- Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JM, Martinez EA, 2003: Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* **60**, 77–87.
- Rozeboom KJ, Troedsson MHT, Molitor TW, Crabo BG, 1998: The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. *J Anim Sci* **77**, 2201–2206.
- Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H, 2002: Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Int J Androl* **25**, 84–93.
- Vadnais M, Kirkwood RN, Tempelman RJ, Sprecher DJ, Chou K, 2005a: Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Anim Reprod Sci* **87**, 121–132.
- Vadnais ML, Kirkwood RN, Sprecher DJ, Chou K, 2005b: Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasmas on capacitation of cryopreserved, thawed



- boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Anim Reprod Sci* **90**, 347–354.
- Verberckmoes S, Van Soom A, de Kruif A, 2004: Intra-uterine insemination in farm animals and humans. *Reprod Domest Anim* **39**, 195–204.
- Waberski D, Weitze KF, Gleumes T, Schwartz M, Willmen T, Petzold R, 1994: Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology* **42**, 831–840.
- Weitze KF, Habeck O, Willmen T, Rath D, 1989: Detection of ovulation in sow using transcutaneous sonography. *Zucht-hygiene* **24**, 40–42.
- Wongtawan T, Saravia F, Wallgren M, Caballero I, Rodriguez-Martinez H, 2006: Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology* **65**, 773–787.

Submitted: 19.06.2006

Author's address (for correspondence): RN Kirkwood, Department of Large Animal Clinical Sciences, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA.  
E-mail: kirkwood@cvm.msu.edu



## 6. Artículo III

Theriogenology 70, 1364-1367 (2008) 418-422 (2007); doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.07.018

### **Practical application of seminal plasma**

**RN Kirkwood, ML Vадnais, M Abad**





## Practical application of seminal plasma

R.N. Kirkwood<sup>\*</sup>, M.L. Vadnais, M. Abad

*Department of Large Animal Clinical Sciences, Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1314, USA*

### Abstract

Natural mating deposits a large number of sperm in a high volume of seminal plasma. Semen processed for AI has the seminal plasma greatly diluted, and processing of boar sperm for cryopreservation removes all seminal plasma. Boar sperm were evaluated for the impact of seminal plasma on the functional status of boar sperm. Seminal plasma prevented or reversed capacitation in frozen–thawed boar sperm. However, supplementing frozen–thawed semen doses with 10% seminal plasma did not significantly affect the number of sperm found in the utero–tubal sperm reservoir, nor did it affect farrowing rates.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Seminal plasma; Frozen–thawed boar semen; Sperm cryopreservation; Artificial insemination; Pig

### 1. Introduction

Natural mating involves the deposition of a large number of sperm in a high volume of seminal plasma. When semen is processed for AI, numbers of sperm and the proportion of seminal plasma in each semen dose are greatly reduced. Furthermore, prior to cryopreservation of boar sperm, all seminal plasma are removed. The obvious question is; does the removal of seminal plasma from the semen adversely affect fertility? Insemination of sows with frozen–thawed (FT) sperm usually results in farrowing rates and litter sizes 20–30% below those achieved with insemination of fresh sperm [1]. This reduced fertility is attributed to the sperm acquiring cryoinjury [2], including a capacitation-like reaction during cooling prior to cryopreservation [3,4]. Following conventional insemination, fresh (non-capacitated) sperm forms the sperm reservoir in

the distal isthmus of each oviduct [5,6]. However, with many FT sperm being effectively capacitated, presumably they cannot associate with the oviductal epithelium and so will not remain in the functional sperm reservoir. Capacitated sperm are capable of fertilizing oocytes but if an oocyte is unavailable, sperm die soon thereafter. The net effect of this is that the life span of FT sperm in the female reproductive tract is considerably shorter than that of freshly ejaculated sperm [3,7].

### 2. Role of seminal plasma

Seminal plasma (SP) exerts physiological effects in the female, including improving sperm transport to the oviduct and advancing time of ovulation [8–10], modulating uterine immune responses [11,12] and possibly uterine remodeling in preparation for conceptus arrival [13]. In addition to effects in the female, seminal plasma has also affected sperm physiology. In vitro, seminal plasma prevented or reversed capacitation in fresh [14,15] and thawed boar sperm [16] (Fig. 1), or that following high dilutions associated with cell sorting [17,18]. Interestingly, the effect of seminal

<sup>\*</sup> Corresponding author at: A202 Veterinary Medical Center, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA.  
Tel.: +1 517 432 5198; fax: +1 517 432 1042.

*E-mail address:* [kirkwood@cvm.msu.edu](mailto:kirkwood@cvm.msu.edu) (R.N. Kirkwood).

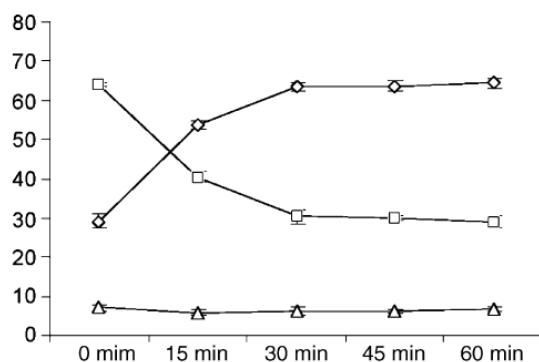


Fig. 1. Effect of 10% boar seminal plasma on the proportion of uncapacitated (◇), capacitated (□) and acrosome-reacted (△) frozen-thawed sperm. The Y-axis is the percent of sperm population and the X-axis the time. Sperm frozen in straws in egg yolk-containing extender was thawed, centrifuged (10 min, 600 × g) and washed in capacitating medium (2 × 600 × g), the pellet resuspended in capacitating medium containing 10% (v:v) seminal plasma, and the sperm incubated for the indicated interval.

plasma was evident after incubation at 39 °C, but not at 17 °C [16]. Furthermore, sperm maintained in their own seminal plasma prior to its removal for extension and then cryopreservation had increased resistance to cold shock [19,20]. Clearly, SP affects sperm physiology in vitro.

An important implication of an ability to reverse capacitation is that the fertile life of cryopreserved sperm should be significantly extended because these sperm would then be capable of associating with oviductal epithelial cells. If this resulted in a larger functional sperm reservoir within the oviduct, perhaps the addition of SP to extended FT sperm would improve sow fertility. The ability to successfully use FT spermatozoa would allow the swine industry to gain the maximum potential in terms of efficiency of spermatozoa use. More importantly, use of FT semen would allow greater protection of herd health, since semen could be quarantined prior to use in the breeding herd.

Table 1

Effect of freezing and supplementation with 10% seminal plasma (SP) on number of sperm recovered from the oviduct and utero-tubal junction of gilts

	AI group		
	Fresh	Frozen	Frozen + SP
No.	13	10	12
Body weight (kg)	125.2 ± 2.7	123.2 ± 2.9	124.2 ± 3.9
Sperm recovered (×10 <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	211.8 ± 84.9	9.1 ± 2.4	8.6 ± 2.2

<sup>a</sup> Fresh > frozen = frozen + SP; *P* < 0.01

Seminal plasma proteins will repair membrane damage associated with cold shock of ram sperm [21]. Further, in vivo ewe fertility to cervical insemination of FT ram sperm was improved when the sperm were supplemented with 30% seminal plasma [22]. No effect was evident subsequently to intrauterine insemination, suggesting that FT sperm fertility was acceptable but that the sperm's ability to reach the oviduct was compromised. Limited work in mares indicated that SP improved fertility of fresh epididymal sperm but not of cryopreserved epididymal sperm exposed to SP before freezing [23]. In contrast, thawing equine sperm in SP improved fertility [24]. Timing of exposure to SP may be a factor in its efficacy, or lack thereof, although numbers of animals used preclude definitive conclusions.

It was recently reported that cryopreserved sperm do not form an effective sperm reservoir [25]. Further, although SP has been shown to reverse cryocapacitation in vitro, when FT semen doses were supplemented with 10% SP, there was no effect on formation of a sperm reservoir (Table 1). Since cryocapacitated sperm cells are not stored in the oviductal sperm reservoir, their fertile lifespan will be very short. Therefore, for acceptable fertilization rates, FT sperm must presumably encounter ova soon after insemination. Indeed, when FT sperm were inseminated very close to the time

Table 2

Farrowing rates and total born litter sizes (mean ± S.E.M.) following artificial insemination of fresh (FS) sperm or cryopreserved (FT) sperm, with or without 10% supplemental seminal plasma (SP) inseminated 2 or 12 h before ovulation<sup>a</sup>

	FS-12 h	FT-12 h	FT-12 h + SP	FT-2 h
No. of sows	25	24	24	26
Parity	2.8 ± 0.3	2.7 ± 0.3	2.7 ± 0.3	3.0 ± 0.4
Farrowing rate (%)	92.0 <sup>b</sup>	37.5 <sup>c</sup>	41.7 <sup>c</sup>	38.5 <sup>c</sup>
Total born litter size	10.3 ± 0.9	8.1 ± 1.3	9.4 ± 1.6	9.6 ± 1.4

<sup>a</sup> FS sperm were inseminated intracervically, but all FT sperm were inseminated transcervically.

<sup>b</sup> Within a row, means without a common superscript differed (*P* < 0.01).

<sup>c</sup> Within a row, means without a common superscript differed (*P* < 0.01).



of ovulation (e.g.  $\leq 4$  h), fertility was greatly improved [26,27], with fertilization rates comparable to those achieved with AI of fresh semen [28].

It was recently documented that farrowing rates remained low after FT inseminations, even when sperm were deposited close to the time of ovulation [29]. Further, results were not improved when FT semen doses were supplemented with 10% seminal plasma (Table 2). Interestingly, a beneficial effect of thawing cryopreserved boar sperm in seminal plasma on in vivo sperm longevity [30] and on gilt and sow fertility has been documented [31,32]. Perhaps SP will improve fertility to FT inseminations, but high supplementation levels are required. Anecdotally, it has been suggested that a minimum level of 30% supplementation with SP will be necessary to positively influence sow fertility. However, this suggestion remains to be critically tested.

## References

- [1] Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:143–72.
- [2] Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000;60–61:481–92.
- [3] Bailey J, Bilodeau J, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 2000;21:1–7.
- [4] Green C, Watson P. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 2001;22:889–98.
- [5] Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt WV. Sperm–oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod* 1999;60:879–86.
- [6] Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim Reprod Sci* 2004;80:131–46.
- [7] Holt W, Medrano A. Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. *J Reprod Fertil* 1997;52(Suppl.):213–22.
- [8] Willmen T, Rabeler J, Everwand A, Waberski D, Weitze KF. Influence of seminal plasma and oestrogens in the inseminate on fertilization rate, sperm transport, and ovulation time. *Reprod Domest Anim* 1991;26(Suppl.):379–83.
- [9] Weitze KF, Rath D, Willmen T, Waberski D, Lotz J. Advancement of ovulation in the sow related to seminal plasma application before insemination. *Reprod Domest Anim* 1990;25:61–7.
- [10] Waberski D, Classen R, Hahn T, Jungblut PW, Parvizi N, Kallweit E, et al. LH profile and advancement of ovulation after transcervical infusion of seminal plasma at different stages of oestrus in gilts. *J Reprod Fertil* 1997;109:29–34.
- [11] Rozeboom KJ, Troedsson MHT, Molitor TW, Crabo BG. The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. *J Anim Sci* 1999;77:2201–6.
- [12] O’Leary S, Jasper MJ, Wames GM, Armstrong DT, Robertson SA. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction* 2004;128:237–47.
- [13] Robertson SA. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J Anim Sci* 2007;85(E. Suppl.):E36–44.
- [14] Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus–oocyte complexes–conditioned medium and hyaluronan. *Int J Androl* 2002;25:84–93.
- [15] Vadnais ML, Kirkwood RN, Tempelman RJ, Sprecher DJ, Chou K. Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Anim Reprod Sci* 2005;87:121–32.
- [16] Vadnais ML, Kirkwood RN, Sprecher DJ, Chou K. Effect of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Anim Reprod Sci* 2005;90:347–54.
- [17] Maxwell WMC, Long CR, Johnson LA, Dobrinski JR, Welch GR. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 1998;10:433–40.
- [18] Maxwell WMC, Johnson LA. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 1999;52:1353–62.
- [19] Tamuli MK, Watson PF. Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation. *Vet Rec* 1994;135:160–2.
- [20] Catt SL, O’Brien JK, Maxwell WMC, Evans G. Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry. *Reprod Domest Anim* 1997;32:251–8.
- [21] Barrios B, Perez PR, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino Blanco T, et al. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod* 2000;63:1531–7.
- [22] Maxwell WMC, Evans G, Mortimer ST, Gillian L, Gellatly ES, McPhie CA. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen–thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 1999;11:123–6.
- [23] Heise A, Gerber D, Volkmann DH, Hahn W, Brouwer NK. Fertility of fresh and frozen–thawed epididymal stallion sperm with or without exposure to seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 2006;19:124 [abstract].
- [24] Alghamdi AS, Madill S, Foster DN. Seminal plasma improves fertility of frozen equine semen. *Anim Reprod Sci* 2005;89:242–5.
- [25] Abad M, Sprecher DJ, Ross P, Friendship RM, Kirkwood RN. Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. *Reprod Domest Anim* 2007;42:149–52.
- [26] Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JM, Martinez EA. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen–thawed spermatozoa. *Theriogenology* 2003;60:77–87.
- [27] Bolarin A, Roca J, Rodriguez-Martinez H, Hernandez M, Vazquez JM, Martinez EA. 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.
- [28] Waberski D, Weitze KF, Gleumes T, Schwartz M, Willmen T, Petzold R. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology* 1994;42:831–40.
- [29] Abad M, Garcia JC, Sprecher DJ, Cassar G, Friendship RM, Buhr M, Kirkwood RN. Effect of insemination–ovulation interval and

- addition of seminal plasma on sow fertility to insemination of cryopreserved sperm. *Reprod Domest Anim* 2007;42:418–22.
- [30] Einarsson S, Viring S. Distribution of frozen–thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different time intervals after insemination. *J Reprod Fertil* 1973;32:117–20.
- [31] Crabo B, Einarsson S. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet Scand* 1971;12:125–7.
- [32] Einarsson S, Swensson T, Viring S. A field trial on the fertility of deep-frozen boar spermatozoa. *Nord Vet Med* 1973;25:372–6.



## 7. Resultados globales y discusión



Las tres publicaciones comprendidas en esta tesis contienen un total de cinco experimentos desarrollados para determinar el efecto de la inseminación con semen congelado (con y sin suplementación de 10% de plasma seminal) en el **establecimiento del reservorio espermático utero-tubárico**, así como los efectos de **la adición de plasma seminal y el momento de inseminación respecto a la ovulación** en la fertilidad y prolificidad obtenidas tras la inseminación artificial con semen descongelado en la especie porcina.

La formación de un reservorio seminal en el segmento inicial del oviducto es un fenómeno habitual entre los mamíferos de varias especies y sirve para asegurar la fecundación y subsecuente desarrollo embrionario a partir del suministro de la cantidad correcta de espermatozoides en el estado fisiológico correcto para la fecundación (Suarez 2002). Los espermatozoides se adhieren al epitelio oviductal a través de una compleja interacción de los carbohidratos presentes en la membrana plasmática (Suárez 2002; Samper 2009). En la primera publicación se describen dos experimentos realizados para determinar la capacidad del semen refrigerado y congelado de crear un reservorio seminal oviductal tras la inseminación artificial (IA) en cerdas nulíparas, así como el efecto que la adición del plasma seminal durante la descongelación del semen congelado tiene sobre el establecimiento de este reservorio.

En el primero de los experimentos, 35 cerdas nulíparas fueron inyectadas intramuscularmente con 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) más 200 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) para la inducción del estro. Tras la confirmación del celo, las cerdas fueron inseminadas con  $3 \times 10^9$  espermatozoides vivos, bien frescos (FS;

n=13), congelados (FT; n=10) o congelados y suplementados con 10% plasma seminal v/v (FT+SP; n=12). Las cerdas fueron sacrificadas 8h más tarde, sus tractos reproductivos recogidos y sus uniones uterotubáricas (UTJs) lavadas para recuperar los espermatozoides. El número de espermatozoides recogidos en cada grupo se muestra en la tabla 7.1, siendo significativamente mayor en el caso de cerdas inseminadas con semen fresco en comparación con semen congelado ( $p < 0.01$ ), y sin observarse efecto evidente tras la adición de plasma seminal a este último grupo.

**Tabla 7.1.** Efecto de la congelación y suplementación con plasma seminal (SP) en el número de espermatozoides recuperados de la union uterotubárica. Resultados del experimento 1.

Tipo de semen	Grupo IA		
	Fresco	Congelado	Congelado + SP
n	13	10	12
Peso vivo (kg)	125.2 ± 2.7	123.2 ± 2.9	124.2 ± 3.9
Nº espermatozoides recuperados ( $\cdot 10^3$ )*	211.8 ± 84.9	9.1 ± 2.4	8.6 ± 2.2

\*p < 0.01.

De manera similar, en el experimento dos se utilizaron 30 cerdas nulíparas a las que se administraron inyecciones intramusculares de 1000 UI de eCG seguidas de 5mg de hormona luteinizante porcina (pLH) 80h más tarde para controlar el momento de la ovulación. Las cerdas fueron inseminadas con  $3 \times 10^9$  espermatozoides vivos FS (n=6), FT (n=15) o FT más 10% plasma seminal (FT+SP; n=9) 12 horas antes del momento de ovulación y sacrificadas 8 horas más tarde. Las UTJs fueron diseccionadas y recogidas para recuperar los espermatozoides. De nuevo la menor cantidad de espermatozoides se recogió

después de la inseminación con semen congelado y no hubo efecto evidente del SP. Los resultados de cada grupo se muestran en la tabla 7.2.

**Tabla 7.2.** Efecto de la congelación y suplementación con plasma seminal (SP) en el número de espermatozoides recuperados de la unión uterotubárica. Resultados del experimento 2.

Tipo de semen	Grupo IA		
	Fresco	Congelado	Congelado + SP
n	6	15	9
Peso vivo (kg)	119.2 ± 5.3	126.1 ± 3.3	135.6 ± 3.9
Nº espermatozoides recuperados ( $\cdot 10^3$ )*	141.6 ± 22.9	19.3 ± 1.3	9.4 ± 1.0

\*p < 0.01.

En ambos experimentos se observa que el tamaño del reservorio seminal en cerdas nulíparas se ve marcadamente reducido tras la inseminación con semen congelado, lo cual coincide con los resultados reportados en otras especies como la equina donde también existe dificultad para el empleo del semen congelado (Dobrinski *et al.*, 1995).

El menor número de espermatozoides localizados en la unión uterotubárica tras la inseminación con semen congelado, en comparación con semen fresco, explicaría al menos parcialmente el habitual descenso de la fertilidad observado en cerdas inseminadas con este tipo de semen en el caso de que la inseminación no se produzca en un período de tiempo muy próximo a la ovulación. No está claro el motivo por el que los espermatozoides que han sido congelados y descongelados reducen su capacidad de unión a las células oviductales. Algunas de las causas sugeridas incluyen los cambios en las interacciones entre los carbohidratos de la membrana plasmática con los diluyentes utilizados, los

cambios en la propia composición de los carbohidratos de la membrana como consecuencia del estrés físico del proceso de congelación-descongelación y la mayor cantidad de calcio intracelular que se observa en los espermatozoides descongelados (Leopold *et al.*, 1998; Dobrinski *et al.*, 1997).

Estudios realizados en cerdas multíparas (Chanapiwat *et al.*, 2012) reportan diferentes cantidades de espermatozoides localizados en la unión uterotubárica tras la inseminación con semen fresco, semen congelado y semen congelado con plasma seminal (1:1 v/v). Independientemente de que los mecanismos específicos del establecimiento del reservorio seminal tras la inseminación con semen descongelado en cerdas nulíparas en comparación con cerdas multíparas aún deban ser estudiados, varios otros factores podrían explicar las diferencias entre estos estudios y los aquí presentados, como el volumen de semen inseminado, el número total de espermatozoides utilizados por dosis, el momento de recogida de los tractos genitales posinseminación, la longitud de los cuernos uterinos, el momento esperado/sucedido de ovulación con respecto a la inseminación y el lugar de deposición del semen congelado dentro del aparato genital femenino.

En los dos experimentos aquí presentados la adición de plasma seminal durante la descongelación del semen a la concentración de 10% v/v no incrementó el número de espermatozoides establecidos posinseminación en la región uterotubárica de las cerdas nulíparas. Esta ausencia de efecto del plasma seminal sugiere que o bien no tuvo efecto en el revertimiento de la criocapacitación o que tal revertimiento no tuvo impacto en la habilidad de creación del reservorio seminal *in vivo*. Varios autores han demostrado *in vitro* que si bien la suplementación con plasma seminal en el momento de la descongelación

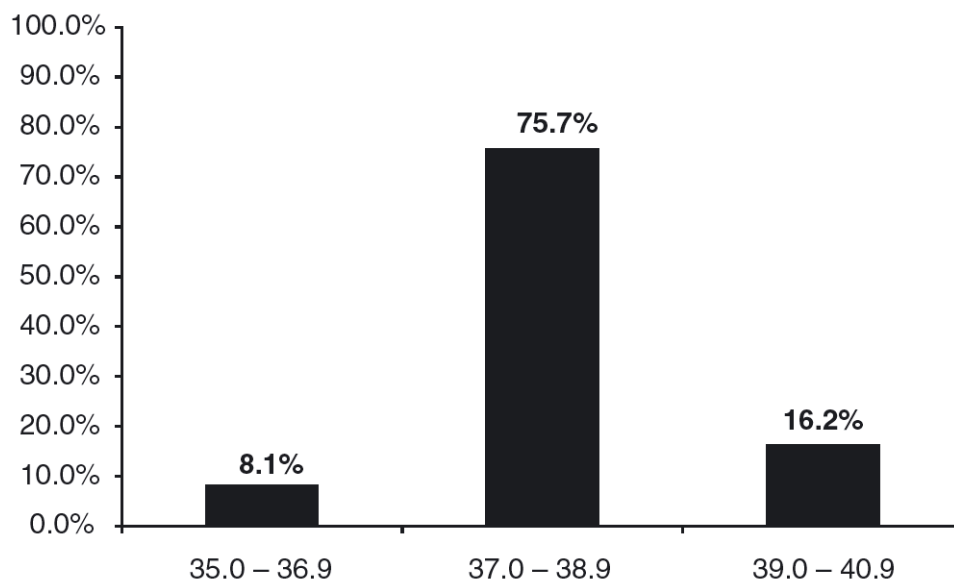
puede revertir la criocapacitación (Vadnais *et al.*, 2005, Caballero *et al.*, 2004) y por ello incrementar tanto la vitalidad como la motilidad espermática (García *et al.*, 2009), este efecto es en todo caso dosis dependiente (Vadnais y Roberts 2007; García 2014). Así, con respecto a la viabilidad de los espermatozoides ese incremento solamente es significativo cuando representa el cincuenta por ciento del volumen final (García 2014). El efecto en el establecimiento del reservorio seminal de una suplementación mayor de plasma seminal durante la descongelación del semen congelado aún debe ser estudiado.

En la segunda publicación se presenta un experimento dirigido al establecimiento de un protocolo hormonal de inseminación a tiempo fijo; y dos experimentos dirigidos a evaluar diferentes factores que afectan a la fertilidad de la hembra tras la inseminación artificial con semen congelado (la deposición más profunda de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino, la inseminación más próxima al momento de ovulación, y el efecto de la adición de plasma seminal durante el proceso de descongelación).

Con el objetivo de establecer un método de inseminación a tiempo fijo se seleccionaron 37 cerdas multíparas en el momento del destete para recibir una inyección intramuscular de 600 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG; Pregnenol®, Bioniche Animal Health, Belleville, ON - Canada) que estimula el desarrollo folicular ovárico. A las 80h después de la administración de eCG, las cerdas recibieron una inyección intramuscular de 5mg de hormona luteinizante porcina (pLH; Lutropin®, Bioniche Animal Health, Belleville, ON . Canada) para la inducción de la ovulación. Los ovarios de las cerdas tratadas fueron monitorizados mediante ecografías transrectales cada 2 horas desde las 34h post administración de pLH hasta el momento de finalización de la ovulación

utilizando un ecógrafo Aloka 500 con sonda líneal de 7.5MHz. El momento de ovulación se definió como el punto medio entre la ausencia observada de folículos mayores de 6mm y el examen anterior (Weitze *et al.*, 1989).

La distribución del momento de ovulación en respuesta a las inyecciones de eCG y pLH se muestra en la figura 7.1. Todas las cerdas ovularon entre las 35 y las 42 horas, con un 75.7% de los animales ovulando en un intervalo de 2h entre las 37 y las 39h. La ovulación ocurrió de manera promedio (media  $\pm$  desviación estándar) a las  $38.4 \pm 0.3$  horas tras la inyección de pLH.



**Figura 7.1.** Porcentaje de cerdas (%) y tiempo transcurrido desde la administración de hormona luteinizante porcina (pLH) hasta la ovulación (h)

Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente por otros autores (Cassar *et al.*, 2005; Pelland *et al.*, 2008) y permiten una alta fiabilidad de este protocolo para estimar el momento previsto de ovulación (MPO) en cerdas multíparas.



En el primero de los experimentos dirigidos a estudiar la fertilidad *in vivo* se utilizaron 122 cerdas multíparas de genética Yorkshire a las que se inyectaron 600UI de eCG al destete seguido de 5mg de pLH 80 horas más tarde para controlar el momento de la ovulación. El momento previsto de ovulación (MPO) fue de 38 horas después de la inyección de pLH. Posteriormente, las cerdas fueron asignadas en base a parto para recibir bien una única inseminación artificial de semen congelado 2 horas antes del MPO o 12h antes del MPO, o con semen congelado suplementado con 10% de plasma seminal a las 12h antes del MPO. Las hembras control recibieron semen fresco a las 12h antes del MPO. Todas las dosis seminales fueron ajustadas a  $3 \times 10^9$  espermatozoides vivos y depositadas intracervicalmente. El experimento dos empleó 99 multíparas y fue una repetición del experimento uno salvo que todas las inseminaciones con semen congelado fueron realizadas poscervicalmente.

En ambos experimentos, las tasas de parto fueron menores ( $p < 0.01$ ) después de las inseminaciones con semen congelado sin observarse efecto del momento de inseminación o de la suplementación de plasma seminal. En el experimento uno, el tamaño de camada fue menor después de la inseminación de semen congelado, pero no se observó efecto en el tamaño de camada en el experimento dos. La adición de plasma seminal no tuvo efecto en el tamaño de camada en ninguno de los dos experimentos. La ausencia de efecto del plasma seminal y del momento de inseminación relativo a la ovulación del semen congelado en la fertilidad sugiere que el daño no letal del proceso de congelación y que afecta a la fecundación comprende más aspectos que la simple criocapacitación.

Se ha descrito repetidamente que el éxito de la fecundación tras la inseminación con semen congelado no depende solo de la calidad de las dosis utilizada, sino también del lugar y momento de inseminación (Martinez *et al.*, 2002; Bolarin *et al.*, 2006; Grosfeld *et al.*, 2008). Es bien conocido que la deposición intracervical de semen congelado requiere altas concentraciones espermáticas por dosis (5-6 x 10<sup>9</sup> espermatozoides) para poder comparar sus resultados de fertilidad con aquellos obtenidos con las dosis estándares de semen fresco (3 x 10<sup>9</sup> espermatozoides) (Roca *et al.*, 2006), y que la breve supervivencia de los espermatozoides congelados en el tracto reproductor femenino puede dejar de ser un limitante cuanto más cerca del oocito se realice la deposición de los espermatozoides (Sumransap *et al.*, 2007). Las nuevas técnicas de deposición intrauterina permiten obtener mejores resultados de fertilidad con el semen congelado mediante el empleo de menor número de espermatozoides por dosis (Rozeboom *et al.*, 2004). De las dos técnicas principales de inseminación intrauterina (poscervical e intrauterina profunda) los estudios aquí presentados utilizaron exclusivamente la poscervical, si bien se ha reportado que mejores resultados pueden ser obtenidos con el semen descongelado utilizando la inseminación intrauterina profunda (Vázquez *et al.*, 2005).

Aunque en estudios anteriores se han obtenido tasas de fertilidad razonables mediante la inseminación de semen congelado dentro de las 4 horas anteriores a la ovulación (Waberski *et al.*, 1994) nuestros resultados demuestran que determinar el momento de inseminación con respecto a la ovulación es un factor necesario pero no suficiente, existiendo otra serie de factores a considerar, entre los que se encuentran la integridad de los espermatozoides post-descongelación y el lugar de deposición del semen

descongelado en el tracto genital femenino. Se ha reportado que el principal factor responsable de la elevada variabilidad entre la calidad de los eyaculados post-descongelación es el individuo, siendo responsable de más del 70% de la variación observada en la calidad espermática post-descongelación (Hernández-Meroño 2008). Igualmente, mediante la selección de eyaculados con buena congelabilidad y una inseminación intrauterina profunda se ha llegado a duplicar la fertilidad obtenida tras la inseminación con semen congelado porcino, llegando a ser semejante a la obtenida con semen fresco para los valores de gestación, parto y prolificidad (Casas *et al.*, 2009). Aunque estas técnicas podrían ser consideradas de difícil aplicación debido a la complejidad de la determinación de la buena congelabilidad, estos mismos autores sugieren que se puede determinar esta capacidad mediante la simple combinación de dos parámetros, motilidad progresiva y la viabilidad a los 240 min post-descongelación.

Se ha reportado que la adición de plasma seminal previene/revierte la capacitación *in vitro* tanto de semen fresco (Suzuki *et al.*, 2002; Vadnais *et al.*, 2005a) como congelado (Vadnais *et al.*, 2005b). Sin embargo, en los experimentos aquí presentados, la adición de plasma seminal en semen descongelado no mostró ningún efecto positivo ni en el establecimiento del reservorio seminal en cerdas nulíparas ni en la fertilidad a parto de cerdas múltiparas. Esto puede ser debido a numerosos factores, entre los que se encuentran la composición del plasma seminal y la concentración final de plasma seminal con respecto al volumen total inseminado, así como la existencia no considerada de diferencias significativas entre verracos individuales. Estos resultados se discuten también en la tercera publicación, en la que además se realiza una revisión de la aplicación práctica del plasma seminal en ganado porcino.

La ausencia de efecto del plasma seminal y del momento de inseminación relativo a la ovulación en la fertilidad sugiere que el daño no letal del proceso de congelación de los espermatozoides comprende más aspectos que la simple criocapacitación. Efectivamente se ha descrito de manera reciente que si bien muchos de los daños producidos durante la congelación afectan a la integridad del acrosoma y a la permeabilidad de la membrana plasmática (como la formación de cristales de hielo citoplasmáticos durante el paso por temperaturas entre  $-15^{\circ}\text{C}$  y  $-60^{\circ}\text{C}$ , la deshidratación celular debido a la alteración de la concentración de solutos/electrolitos durante el proceso de congelación y el shock osmótico producido durante el proceso de descongelación), existen otros que afectan a componentes importantes para la función espermática durante la fecundación y posterior desarrollo embrionario, como los observados en el núcleo espermático y en la integridad de la cromatina, fragmentación del DNA, translocación de nucleoproteínas (protamina 1, P1, e histona 1, H1), y la disrupción de los puentes disulfuro entre los radicales de cisteína de la P1 (Yeste 2015).

El plasma seminal es una mezcla de secreciones de los testículos, epidídimo y de las glándulas accesorias de los órganos reproductores del verraco y se compone de diferentes sustancias con actividad sobre la función espermática. La mayor parte de estas sustancias son proteínas pertenecientes a la familia de las espermadhesinas, entre cuyas funciones se encuentra prevenir las reacciones acrosomales prematuras, regular la capacitación espermática y aportar otros beneficios significativos a la viabilidad del esperma (Caballero *et al.*, 2008). Pese a que se ha reportado una amplia variación tanto del perfil de proteínas como de su concentración en las diferentes fracciones del eyaculado y se han encontrado diferencias significativas en la capacidad de los espermatozoides para

sobrevivir al proceso de criopreservación según la fracción del eyaculado a la que perteneciesen (Saravia *et al.*, 2009), quizás el principal factor que afecta al grado de efecto del plasma seminal durante la descongelación es la propia variabilidad individual entre verracos (Caballero *et al.*, 2004).

Debido precisamente a la dificultad de determinar aquellos componentes del plasma seminal con efectos beneficiosos sobre los daños posdescongelación, en los experimentos realizados se utilizó siempre un pool de plasma seminal proveniente de diferentes eyaculados, lo cual si bien se ha reportado puede ser conveniente para minimizar la variabilidad (Caballero *et al.*, 2004) diversos autores inciden recientemente en que puede ser perjudicial (Hernandez *et al.*, 2007). Igualmente, en los experimentos presentados se utilizaron concentraciones de plasma seminal del 10% v/v, mientras que estudios recientes describen que el efecto del principio activo o principios activos del plasma seminal sobre la funcionalidad de los espermatozoides *in vitro*, y posiblemente *in vivo*, es dependiente de su concentración (Vadnais and Roberts 2007; Garcia *et al.*, 2010), alcanzándose *in vivo* resultados positivos de fertilidad con niveles de inclusión del 50% de plasma seminal (García *et al.* 2010, García 2014). Nuestros estudios coinciden con aquellos más recientemente realizados (García 2014) en los que se sugiere que tanto la composición del plasma seminal de los verracos donantes como la concentración en el volumen final son factores a examinar exhaustivamente antes del uso del plasma seminal como medio de dilución orientado a incrementar la fertilidad tras la inseminación con semen congelado porcino.



## 8. Conclusiones





## **PRIMERA**

El protocolo hormonal utilizado para la sincronización (600 UI de eCG seguido de 5mg de pLH 80 horas después) permite determinar con elevada precisión el rango de ovulación en la población de cerdas multíparas. En nuestro estudio publicado el 100% de las cerdas respondieron satisfactoriamente al tratamiento hormonal y más de un 75% de los animales ovularon en un intervalo de 2horas, entre las 37 y las 39h post administración de pLH.

## **SEGUNDA**

La inseminación de semen descongelado en cerdas nulíparas da lugar a un menor número de espermatozoides localizados en el reservorio seminal oviductal a las 8h post inseminación, en comparación con la inseminación convencional con semen fresco. Igualmente, la adición de un 10% de plasma seminal a la descongelación no aumenta la cantidad de espermatozoides establecidos en el reservorio seminal de cerdas nulíparas en este mismo período de tiempo.

### **TERCERA**

En porcino, la adición de un 10% de plasma seminal a la descongelación y la inseminación artificial próxima al momento estimado de ovulación no son suficientes para que la fertilidad obtenida *in vivo* con semen descongelado sea próxima a la que habitualmente se obtiene con semen refrigerado. Otros parámetros como la integridad funcional de los espermatozoides posdescongelación y la composición/concentración del plasma seminal utilizado deben ser considerados.

### **CUARTA**

Es necesario profundizar en el estudio de los daños sufridos por los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación, ya que nuestros resultados sugieren que los daños sufridos por los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación van más allá de los asociados a la comúnmente conocida criocapacitación.

## 9. Bibliografía



**Abad Gavin M. 2001.** History of Animal Reproduction. *III Iberian Congress of Animal Reproduction, Porto (Portugal) pp 11-22.*

**Abad M, Sprecher DJ, Ross P, Friendship RM, Kirkwood RN. 2007a.** Effect of Sperm Cryopreservation and Supplementing Semen Doses with Seminal Plasma on the Establishment of a Sperm Reservoir in Gilts. *Reprod Dom Anim 42, 149–152*

**Abad M, Sprecher DJ, Ross P, Friendship RM, Kirkwood RN. 2007b.** Effect of Insemination–Ovulation Interval and Addition of Seminal Plasma on Sow Fertility to Insemination of Cryopreserved Sperm. *Reprod Dom Anim 42, 418–4222*

**Ashworth PJC, Harrison RAP, Miller NG, Plummer JM, Watson PJ. 1994.** Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Develop 6, 173-180.*

**Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. 1996.** Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: Role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci 1, d189-205.*

**Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. 2000.** Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci 5, E110–E123.*

**Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G. 2002.** Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J Reprod Immunol* 53, 121–131.

**Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. 2000.** Semen cryopreservation in domestic animals; a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 21, 1–7.

**Bailey J, Morrier A, Cormier N. 2003.** Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Can J Anim Sci* 83, 393–401.

**Bellin ME, Oyarzo JN, Hawkins HE, Zhang H, Smith RG, Forrest DW, Sprott LR, Ax RL. 1998.** Fertility-Associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J Anim Sci* 76, 2032-2039

**Bertani GR, Scheid IR, Rubin MIB, Wentz I, Goncalves PBD. 1997.** Effect of the time of artificial insemination with frozen-thawed or fresh semen on embryo viability and early pregnancy rate in gilts. *Theriogenology* 48, 933-945

**Bolarín A, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Hernández M, Vázquez JM, Martínez EA. 2006.** Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen–thawed semen is used. *Theriogenology* 65 (3), 669–680.

**Breitbart H, Rubinstein S, Lax Y. 1997.** Regulatory mechanisms in acrosomal exocytosis. *Rev Reprod* 2,165–174.

**Buhr M. 2001.** Emerging tools in artificial insemination. *London Swine Conference - The Pork Industry and Public Issues 5-6 April 2001*

**Caballero, I., Vazquez, J.M., Centurion, F., Rodriguez-Martinez, H., Parrilla, I., Roca, J., Cuello, C., Martinez, E.A. (2004).** Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 39, 370–375.

**Caballero, I., Vazquez, J.M., Garcia, E.M., Parrilla, I., Roca, J., Calvette, J.J., Sanz, L., Martinez, E.A. (2008).** Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology* 70, 1352–1355.

**Calvete JJ, Ensslin M, Mburu J, Iborra A, Martinez P, Adermann K, Waberski D, Sam L, Topfer-Petersen E, Weitze KF, Einarsson S, Rodriguez-Martinez H. 1997.** Monoclonal antibodies against boar sperm zona pellucida-binding protein AWN- 1. Characterization of a continuous antigenic determinant and immunolocalization of AWN epitopes in inseminated sows. *Biol Reprod* 57, 735-742.

**Candini PH, Moretti AS, Silveira PRS, Zanella E, Viana CHC, Santos ICC. 2001.** Utilization of a protocol of synchronization of ovulation, induced by porcine LH, to perform insemination programs in fixed time, with one or two inseminations per sow. *Proc 6th Int Conf Pig Reproduction, 2001.*

**Carvajal G, Cuello C, Ruíz M, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J. 2004.** Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J. Androl.* 25 (3), 389–396.

**Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Garcia-Gil N, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Fàbrega A, Rodríguez-Gil JE, Bonet S. 2008.** Valuable boar sperm parameters when searching for freezability traits. *Proceedings of the VIth International Conference on Boar Semen Preservation, Alliston, ON, Canada, 2008. Theriogenology* 70 (8), 1396.

**Casas, I., Sancho, S., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., Yeste, M., Fàbrega, A., Puigmulé, M., Garcia, E., Bonet, S., 2008b.** Quality of frozen–thawed boar sperm after different dilutions in BTS. *Proceedings of the 1st Joint International Meeting Spanish Association for Animal Reproduction and the British Andrology Society, Gijón, Spain. Reprod. Domest. Anim.* 43 (4), 72.

**Cassar G, Kirkwood RN, Poljak Z, Friendship RM. 2004.** Effect of estrogen formulation and site of deposition on fertility of artificially inseminated sows treated with human chorionic gonadotrophin to induce ovulation. *J Swine Health Prod* 12, 285-287.

**Cassar G, Kirkwood RN, Poljak Z, Bennett-Steward K, Friendship RM. 2005.** Effect of single or double insemination on fertility of sows bred at an induced estrus and ovulation. *J Swine Health Prod* 13, 254-258.



**Centurion F, Vazquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, Garcia EM, Martinez EA. 2003.** Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol. Reprod.* 69, 640–646.

**Chanapiwat P, Kaeoket K, Tummaruk P. 2012.** Distribution of spermatozoa in the reproductive tracts of sows after intra-uterine insemination using frozen-thawed boar semen. *Thai Vet Med* 42 (3): 359:3966

**Ciereszko A, Ottobre JS, Glogowski J. 2000.** Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Anim Reprod Sci* 64, 89-96.

**Claus R. 1990.** Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig. *J Reprod Fertil (Suppl)* 40, 117–31.

**Crabo B, Einarsson S. 1971.** Fertility of deep frozen spermatozoa. *Acta Vet Scand* 12, 125-127.

**De Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. 1997.** Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3, 175-94.

**De Rensis F, Benedetti S, Silva P, Kirkwood RN. 2003.** Fertility of sows following artificial insemination at a gonadotrophin-induced estrus coincident with weaning. *Anim Reprod Sci* 76, 245-250.

**Dobrinski I, Thomas PGA, Ball BA. 1995.** Cryopreservation reduces the ability of equine sperm to attach to oviductal epithelial cells and zona pellucida. *J Androl* 16, 536

**Dobrinski I, Smith TT, Suarez SS. 1997.** Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 56: 861-869

**Dziuk PJ, Henshaw G. 1958.** Fertility of boar semen artificially inseminated following in vitro storage. *J Anim Sci* 17, 554–558.

**Eriksson B. 2000.** Cryopreservation of boar semen. Studies on sperm viability in vitro and fertility. *PhD Thesis. Uppsala: Swedish University of Agriculture Sciences.*

**Estienne MJ, Allen FH. 2005.** Using artificial insemination in swine production: Detecting and synchronizing estrous and using proper insemination technique. *Virginia Cooperative Extension Publication 414-038.*

**Excelpork Plus™. 2014.** Informe de coyuntura del sector porcino.

**Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt WV. 1999.** Sperm–oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod* 60, 879–86.

**Foote RH. 2002.** The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci.* 80. *Electronic Supplement 2. Peer-reviewed papers from the 2001 ASAS National Meeting.*

**Gadella BM, Harrison RAP. 2000.** The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane. *Development* 127, 2407–2420.

**Garcia, J.C., Dominguez, J.C., Pena, F.J., Alegre, B., Gonzalez, R., Castro, M.J., Habing, G.G., Kirkwood, R.N. 2009.** Thawing boar semen in seminal plasma: Effects on sperm quality in vitro and sow fertility. *Anim.Reprod. Sc.* 119, 160-165.

**Garcia JC. 2014.** Utilización del control ovulatorio posdestete y la adición de plasma seminal en la optimización de la inseminación artificial porcina, con semen fresco y criopreservado. *PhD Thesis. University of Leon (ES).*

**Garner DL, Thomas CA, Gravance CG, Marshall CE, DeJarnette JM, Allen CH. 2001.** Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology* 56, 31–40.

**Gerrits RJ, Lunney JK, Johnson LA, Pursel VG, Kraeling RR, Rohrer G, Dobrinsky JR. 2005.** Perspectives for artificial insemination and genomics to improve swine populations. *Theriogenology* 63, 283-299.

**Gil MA, Roca J, Cremades T, Hernández M, Vázquez JM, Rodríguez- Martínez H, Martínez EA. 2005.** Does multivariate analysis of postthaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates? *Theriogenology* 64, 305–316.

**Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. 1997.** Capacitation status and fertility of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9, 481–487.

**Graham JK. 1994.** Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* 41, 1151-1162.

**Graham EF, Rajamannan AHJ, Schmehl MKL, Maki-Laurila M, Bower RE. 1971.** Fertility studies with frozen boar spermatozoa. *AI Digest* 19:61.

**Green CE, Watson PF. 2001.** Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 122, 889-898.

**Großfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WM, Rath D. 2008.** New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 70 (8), 1225–1233.

**Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan P. 1990.** Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl* 11, 73–88.

**Harrison RAP, Ashworth PJC, Miller NGA. 1996.** Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 45, 378–91.

**Harrison RAP. 1997.** Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *J Reprod Fertil (Suppl)* 52, 195–211.

**Hernandez M, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA, Vázquez JM, Martínez EA. 2007.** Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J Androl* 2007;28:689–697

**Hofmo PO, Grevle IS. 2000.** Development and commercial use of frozen boar semen in Norway. In: Johnson LA, Guthrie HD, (eds). *Boar semen preservation IV*. Lawrence KS: Allen Press; pp. 71-77.

**Holt WV. 2000a.** Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.

**Holt WV. 2000b.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62, 3-22.

**Hunter RHF. 1981.** Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fertil* 63, 109–117.

**Hunter RHF. 2002.** Vital aspects of fallopian tube physiology in pigs. *Reprod Dom Anim* 37, 186-190.

**Ito T, Niwa T, Kudo A. 1948.** Studies on artificial insemination in swine. *Zootech Exp Sta Res Bull* 55, 1-74.

**Johnson LA, Larksson K. 1985.** eds. Deep freezing of Boar semen. *Uppsala: Swedish University of Agriculture Sciences Press; 1985. 310 p.*

**Johnson LA. 1998.** Current developments in swine semen: preservations, artificial insemination and sperm sexing. *Proc IPVS, 1*, 225–229.

**Johnson LA, Witze KF, Fiser P, Maxwell WMC. 2000.** Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62, 143-172.

**Kaeoket K, Persson E, Dalin AM. 2003.** Influence of pre-ovulatory insemination and early pregnancy on the infiltration by cells of the immune system in the sow endometrium. *Anim Reprod Sci* 75, 55–71.

**Kemp B, Soede NM. 1996.** Relationship of weaning-to-estrus interval to timing of ovulation and fertilization in sows. *J Anim Sci* 74, 944-949.

**Kirkwood RN. 1999.** Pharmacological intervention in swine reproduction. *Swine Health Prod* 7, 29-35.

**Kirkwood RN, Vadnais ML, Abad M. 2008.** Practical application of seminal plasma. *Theriogenology* 70: 1364-1367

**Knox RV, Rodriguez-Zas SL. 2001.** Factors influencing estrous and ovulation in weaned sows as determined by transrectal ultrasound. *J Anim Sci* 79, 2957–2963.

**Krueger C, Rath D. 2000.** Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. *Reprod Fertil Dev* 12, 113-117.

**Leopold S, Samper JC, Curtis E, Buhr MM. 1998.** Effect of cryopreservation and oviductal cell conditioned media on calcium flux in equine spermatozoa. *Proc 7<sup>th</sup> Symp Equine Reproduction. Pretoria. South Africa*

**Levis DG. 2000.** Liquid boar semen production: current extender technology and where we go from here. In: *Johnson LA, Guthrie HD, (eds). Boar semen preservation IV. Lawrence, KS: Allen Press pp 121-128.*

**Liu Z, Foote RH. 1998.** Osmotic effects on volume and motility of bull sperm exposed to membrane permeable and non-permeable agents. *Cryobiology* 37, 207-218.

**Manjarin R. 2013.** Nuevas estrategias en el manejo hormonal de la reproducción en las cerdas nulíparas. *PhD Thesis. University of Leon (ES).*

**Martin D. 2014.** Estrategias en el manejo reproductivo de la cerda para la mejora de la fertilidad. *PhD Thesis. University of Leon (ES).*

**Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL, Day BN. 2001a.** Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *Reproduction 122, 289-296.*

**Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL. 2001b.** Deep intrauterine insemination in sows with a low number of spermatozoa: A new and simple procedure. *Theriogenology 55, 248 (abstr).*

**Maxwell WMC, Welch GR, Johnson LA. 1997.** Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Develop 8, 1165-1178.*

**Maxwell WMC, Evans G, Mortimer ST, Gillan L, Gellatly ES, Mephie CA. 1999.** Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Develop 11, 123-126.*

**Maxwell WMC, Johnson LA. 1999.** Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology 48, 209-219.*

**Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS. 1985.** Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *Am J Vet Res 46, 473-475.*



**Nagase H, Graham EF. 1964.** Pelleted semen: Comparison of different extenders and processes on fertility of bovine spermatozoa. *In: Proc 5th Int. Congr Anim Reprod AI, Trento, Italy. 4, 387–391.*

**Nissen AK, Schmidt M Hyttel P, Greve T. 1995.** Ultrasonography of ovulation in relation to first cleavage in hCG treated sows. *Theriogenology 43, 287.*

**Nissen AK, Soede NM, Hyttel P, Schmidt M, D’Hoore L. 1997.** The influence of time of insemination relative to time of ovulation on farrowing frequency and litter size in sows, as investigated by ultrasonography. *Theriogenology 47, 1571-1582.*

**Nissen AK, Schmidt M, Hyttel P, Greve T. 2000.** Ovulation and embryonic developmental rate following hCG-stimulation in sows. *Acta Vet Scand 41, 321-328.*

**Noiles EE, Bailey JL, Storey BT. 1995.** Temperature dependence of the water permeability,  $L_p$ , of murine sperm shows a discontinuity between 4° and 0°C. *Cryobiology 32, 220–238.*

**Okazaki, T., Abe, S., Yoshida, S., Shimada, M. 2009.** Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor postthaw semen quality. *Theriogenology 71, 491–498.*

**Okazaki T, Akiyoshi T, Kan M, Mori M, Teshima H, Shimada M. 2012.** Artificial insemination with seminal plasma improves the reproductive performance of frozen-thawed boar epididymal spermatozoa. *J Androl* 33, 990–998.

**Parks JE. 1997. Hypothermia and mammalian gametes. In: Karow AM, Critser J K (eds) Reproductive tissue banking. San Diego: Academic Press 1997, pp 229-261.**

**Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. 1988.** Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38, 1171–1180.

**Pelaez J. 2004.** Congelacion de semen porcino. Aportaciones a la congelabilidad y fertilidad. *PhD Thesis. University of Leon (ES).*

**Pelland C, Cassar G, Kirkwood R. 2008.** Fertility after intrauterine insemination with conventional or low numbers of spermatozoa in sows with synchronized ovulation. *J Swine Health Prod.* 16 (4):188–192.

**Petrunkina AM, Friedrich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D, Topfer-Petersen E. 2001.** Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction* 122, 469-480.

**Polge C. 1956.** Artificial insemination in pigs. *Vet Rec* 68, 62-76.

**Polge C, Salamon S, Wilmut I. 1970.** Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet Rec* 87, 424-429.

**Pursel VG. 1982.** Effect of uterine ligation and cervical plugs on retention of frozen-thawed boar sperm. *J Anim Sci* 54, 137-141.

**Pursel VG, Johnson LA. 1971.** Procedure for the preservation of boar spermatozoa by freezing. *USDA ARS, Bull No 44-227, 1-5.*

**Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL. 1973.** Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J Anim Sci* 37, 528-31.

**Pursel VG, Johnson LA. 1975.** Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* 40, 99-102.

**Rath D, Niemann H. 1997.** In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* 47, 785-793.

**Rodriguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vazquez JM, Martinez E, Roca J, Sanz L, Calvete JJ. 2005.** Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology* 63, 514-535.

**Rozeboom KJ, Troedsson MHT, Crabo BG. 1998.** Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. *J Reprod Fertil* 114, 195–199.

**Rozeboom KJ, Troedsson MH, Hodson HH, Shurson GC, Crabo BG. 2000.** The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. *J Anim Sci* 78, 443–448.

**Rozeboom KJ, Reicks DL, Wilson ME. 2004.** The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. *J Anim Sci* 82, 2164-2168.

**Samper Juan C. 2009.** Equine breeding management and artificial insemination. *2nd Ed.*  
*ISBN: 978-1-4160-5234-0*

**Selles E. 2001.** Estudio de diferentes factores que afectan a la calidad y capacidad fecundante de los espermatozoides crioconservados en la especial porcina. *PhD Thesis.*  
*University of Murcia (ES).*

**Soede NM, Bowman EG, Kemp B. 1998.** Seminal plasma does not advance ovulation in hCG-treated sows. *Anim Reprod Sci* 54, 23-29.

**Soede NM, Steverink DW, Langendijk P, Kemp BJ. 2000.** Optimized insemination strategies in swine AI. In: *LA Johnson, HD Guthrie (eds): Boar Semen Preservation IV.*  
*Allen Press Inc. Lawrence, Kansas. pp. 185-190.*

**Steverink DW, Soede NM, Bouwman EG, Kemp BJ. 1997.** Influence of insemination-ovulation interval and sperm cell dose on fertilization in sows. *J Reprod Fertil* 111, 165-171.

**Steverink DWB, Soede NM, Bouwman EG, Kemp B. 1998.** Semen backflow after insemination and its effect on fertilization results in sows. *Anim Reprod Sci* 54, 109-119.

**Straw B.** Swine Health Resource. *Michigan State University Extension Program.*  
<http://www.msu.edu/%7Estraw/>

**Suarez SS, Revah I, Lo M, Koelle S. 1998.** Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent lectin on sperm that recognizes Lewisia trisaccharide. *Biol Reprod* 59, 39–44.

**Suarez SS. 2002.** Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Dom Anim* 37, 140-143.

**Sumransap P, Tummaruk P, Kunavongkrit A. 2007.** Sperm distribution in the reproductive tract of sows after intrauterine insemination. *Reprod. Domest. Anim.* 42 (2), 113–117.

**Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. 2002.** Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus–oocyte complexes- conditioned medium and hyaluronan. *Int J Androl* 25:84–93.

**Tardif S, Dube C, Chevalier S, Bailey JL. 2001.** Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod* 65, 784–92.

**Tardif S, Dube C, Bailey JL. 2003.** Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod* 68, 207–13.

**Topfer-Petersen E, Wagner A, Friedrich J, Petrunkina A, Ekhlasi-Hundriesen M, Waberski D. 2002.** Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *J Exp Zool* 292, 210–5.

**Vadnais ML, Kirkwood RN, Tempelman RJ, Sprecher DJ, Chou K. 2005a.** Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Anim Reprod Sci* 87, 121-132.

**Vadnais ML, Kirkwood RN, Sprecher DJ, Chou K. 2005b.** Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasmas on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Anim Reprod Sci* 90, 347-354.

**Vadnais, M.L., Roberts, K.P. 2007.** Effects of seminal plasma on cooling induced capacitative changes in boar sperm. *J. Androl.* 28, 416–422

**Vazquez JM, Martínez EA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Gil MA, Lucas X, Centurion F, Vazquez JL, Roca J. 2000.** Deep uterine insemination in sows with flow cytometric sorted sperm. *Theriogenology* 53, 389 (abstr).

**Vázquez JM, Martínez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Lucas X, Vázquez JL. 2005.** Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology* 63 (2), 536–547.

**Visconti PE, Kopf GS. 1998.** Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59, 1–6.

**Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. 2002.** Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 53, 133-150.

**Vyt P, Maes D, Rijsselaere T, Dejonckheere E, Castryck F, Van Soom A. 2004.** Motility assessment of porcine spermatozoa: a comparison of methods. *Reprod Dom Anim* 39, 447-453.

**Waberski D, Weitze KF, Lietmann C, Lubbert zur Lage W, Bortolozzo FP, Willmen T, Petzoldt R. 1994a.** The initial fertilizing capacity of long term-stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. *Theriogenology* 41, 1367-1377.

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

**Waberski D, Claassen R, Hahn T, Jungblut PW, Parvizi N, Kallweit E, Weitze KF. 1997.** LH profile and advancement of ovulation after transcervical infusion of seminal plasma at different oestrous stages in gilts. *J Reprod Fertil* 109, 29–34.

**Wagner HG, Thibier M. 2002.** World Statistics for Artificial Insemination in small ruminants and swine. In: Proceedings of the 14th International congress on Animal *Reproduction* 2, 77.

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

**Weitze KF, Wagner-Rietschel H, Waberski D, Richter L, Krieter J. 1994.** The onset of estrus after weaning, estrus duration and ovulation as major factors in AI timing in sows. *Reprod Dom Anim* 29, 433-443.

**Weitze KF. 2000.** Update on the worldwide application of swine AI. In: *LA Johnson, HD Guthrie (eds). Boar semen preservation IV. Lawrence, KS: Allen Press; 2000. pp. 141-145.*



**Westendorf P, Richter L, Treu H. 1975.** Deep freezing of boar sperm. Laboratory and insemination results using the Hulsenberger paillete method. *Dtsch Tieraztl Wochenschr* 82, 261-267.

**Wiggins EL, Grummer RH, Casida LE. 1951.** Minimal volume of semen and number of sperm for fertility in artificial insemination of swine. *J Anim Sci* 1, 138-143.

**Willenburg KL, Knox RV, Kirkwood RN. 2004.** Effect of estrogen formulation and its site of deposition on serum PGFM concentrations, uterine contractility, and time of ovulation in artificially inseminated sows. *Anim Reprod Sci* 80, 147-156.

**Yanagimachi R. 1994.** Mammalian fertilization. In: *Knobil A, Neill JD (eds). The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press. 189–317.*

**Yeste M. 2015.** Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology, in press*

**Zhu, J. 2000.** Boar seminal plasma components and fertilization. *MSc Thesis, University of Alberta, Canada.*