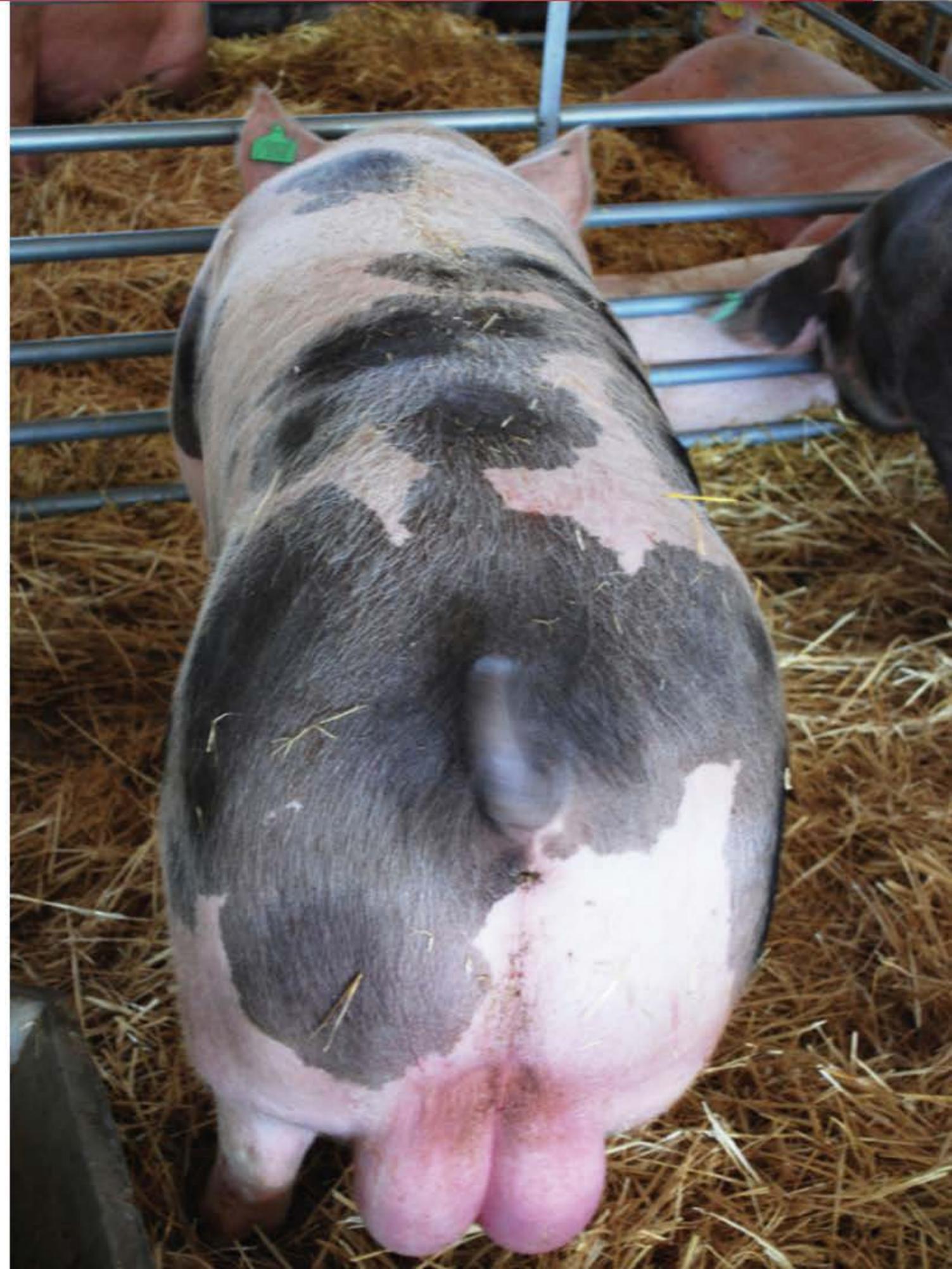


Domínguez Fdez-Tejerina, J.C.; Ngula, J.; Tejedor Sanz, I.; Alegre Gutiérrez, B.; Martínez-Pastor, F.; Alonso de la Varga, M.E.; González-Montaña, R.; y Gómez Seco, C.

Grupo de Investigación "Reproducción Animal" (170 UNIVERSITAS XXI) de la Universidad de León. jcdomt@unileon.es

Estimulantes espermáticos en la inseminación artificial porcina

*(Sperm stimulants
in swine artificial
insemination)*



Resumen

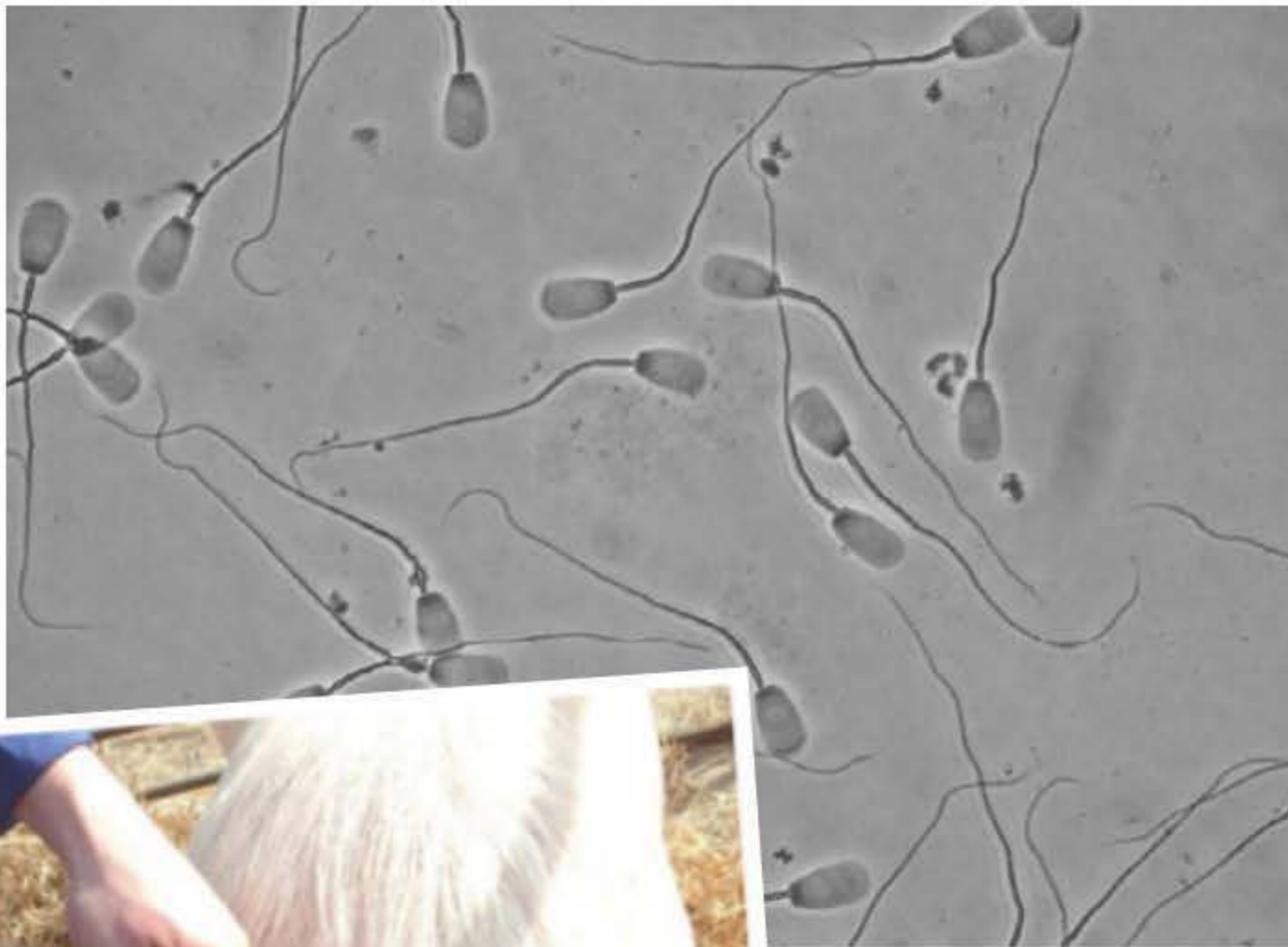
Los estimulantes espermáticos, conocidos también como potenciadores o aditivos seminales, son un grupo de sustancias, clasificadas en cuatro categorías (estimulantes de la motilidad espermática, hormonas, enzimas y otras diversas), que añadidas al semen en el momento previo a la inseminación de las hembras mejoran la fertilidad y/o la prolificidad. En el presente artículo expondremos nuestras últimas investigaciones sobre un estimulante espermático porcino (EEP), de tipo “combinado”, aplicable a la optimación de los resultados de la inseminación artificial porcina (IAP).

Introducción

Los *estimulantes espermáticos*, conocidos también como “*aditivos o potenciadores seminales*”, son aquellas sustancias que no siendo necesarias para la conservación seminal e incluso perjudiciales para la misma, sin embargo mejoran la fertilidad y/o la prolificidad del semen cuando son aplicadas a las dosis seminales en el momento inmediatamente anterior a la inseminación de la hembra, bien actuando sobre las características intrínsecas del semen (p. e.: incrementando la motilidad, favoreciendo la capacitación espermática, etc.), o bien implicando en el organismo de la hembra inseminada reacciones favorables para el éxito fecundante de la inseminación.

La primera referencia histórica a los potenciadores seminales, la hizo Milovanov en 1964, al proponer una nueva clasificación de los medios de dilución seminal en tres categorías: *extensores*, serían aquellos cuya única misión es incrementar el volumen seminal; *protectores*, cuya finalidad sería conservar el semen y protegerlo del efecto deletéreo que produce la refrigeración o congelación; e *implementadores* cuya finalidad es la de mejorar las condiciones de la fecundación y viabilidad embrionaria, haciendo referencia expresa a dos sustancias concretas como la hialuronidasa (favorecedora de la conjugación gamética) y la oxitocina (estimulante de las contracciones uterotubáricas que intervienen en el transporte espermático).

Si bien Milovanov (1964), auguró un gran porvenir a los potenciadores seminales, constatando incrementos de la fertilidad en la vaca y la cerda entre el 13 y el 28%, no es hasta avanzados los años 70 del pasado siglo, cuando con el desarrollo de la fecundación “*in vitro*” (FIV), se comienzan a utilizar sustancias, como la cafeína o los ionóforos de calcio, para favorecer la hipercinesis y la capacitación espermática necesarias para el éxito fecundante, especialmente de semen oligospermico e hipocinético.



Inseminación artificial porcina (IAP)

La IAP es una tecnología de la reproducción mediante la cual, sin la participación directa del macho, se deposita semen fecundante en el útero de la cerda en un momento adecuado de su ciclo estral (ovulación), pretendiendo conseguir su gestación (Knox, 2016).

El pionero en utilizar la IAP fue Ivanov (1907, 1922), en Rusia, quien además desarrolló el primer diluyente para semen. Ateo *al.*, en 1948 recomiendan que el semen porcino debía refrigerarse entre 15-20°C, con objeto de incrementar su tiempo de conservación. Esto fue constatado por Johnson (1998) y Levis (2000), demostrando que, si se conserva entre 15 y 17°C, el semen porcino puede mantener su viabilidad fecundante hasta los 7 días posrecogida.

IAP es una tecnología ampliamente implantada debido a la tecnificación del sector y como herramienta necesaria para la mejora genética, la sencilla metodología y los buenos resultados que conlleva. Se adapta a las necesidades de un sector que está en continua evolución y en un mundo en el que se impone “máximo rendimiento al mínimo coste”, si bien es cierto que, en términos de desarrollo tecnológico, se han encontrado algunas limitaciones como es la imposibilidad de la aplicación de semen congelado de forma masiva

(Roca *et al.*, 2016). *No obstante*, Los países desarrollados han adoptado la IAP como una forma rutinaria de reproducción en grandes explotaciones porcinas, llegando a utilizarse en la actualidad en un rango superior al 90% de las mismas.

La IA ofrece numerosas ventajas; se evitan los problemas tanto sanitarios como de bienestar animal durante el transporte de sementales (que normalmente era necesario introducir en las explotaciones porcinas), se reduce el riesgo de transmisión y aparición de enfermedades infecto-contagiosas por vía sexual, así como, el número de cerdos que es necesario mantener. Se ha conseguido una multiplicación de la proge- nie de alto valor genético que ha ayudado a la rentabilidad de las granjas, tanto productiva como de calidad, e incluso con un bajo número de espermatozoides por dosis seminal (Roca *et al.*, 2011). Además, ayuda a la conservación de la capacidad fecundante en el tiempo y permite controlar la calidad esper- mática de los sementales que están sujetos a múltiples efectos ambientales, de manejo y sanitarios.

Por otro lado, también tiene sus desventajas, y estos pro- blemas son los que habrá que solucionar (Roca *et al.*, 2015). La prolificidad y fertilidad son los dos parámetros con los que se mide el rendimiento reproductivo y a su vez económi- co en las explotaciones porcinas (Bichard, 1985), obteniendo resultados inferiores en la IA. En el estudio realizado por la British Meat and Livestock Commision en 1996, se cons- tata que la fertilidad media en monta natural es del 85% mientras que en la IA es del 77%. En estudios más recientes

(Broekhuijse Feitsma, & Gadella, 2012) se justifica este pro- blema con un fallo en las variables a medir en el semen de cerdo, ya que no hay parámetros que midan la subfertilidad del macho semental como individuo. Otro de los proble- mas realmente importante en muchas explotaciones es lo conocido como “síndrome de infertilidad de verano”, que afecta tanto a la cerda como al verraco, produciéndose en los meses de verano un descenso en la fertilidad y obligan- do a incrementar el manejo, lo que supone, además, mayor gasto (Ngula, 2015). La detección del celo en la hembra es un factor importante para determinar el tiempo óptimo de la primera IA (12-30 horas tras detectar el celo) lo que puede dar fallo si se detecta erróneamente (Goodwin, 1995; Hughes, 1994). La estructura y disposición del aparato genital femenino dificultan aún más la IA, teniéndola que aplicar de forma intrauterina en la mayoría de los casos. En cuanto al macho, tenemos la dificultad del mal resul- tado en la congelación del semen, siendo un limitante a la hora del transporte y conservación de las características del eyaculado (Erikson & Rodríguez-Martínez, 2000). Además, tenemos que contar con la posibilidad del error humano.

El proceso de la IAP, puede resumirse en las siguientes etapas: recolección del eyaculado con mano enguantada, dilución y preparación de las dosis seminales, refrigeración, evaluación de la calidad seminal, inseminación de la cerda, transporte espermático hasta el oviducto por contracciones uterinas, fecundación y gestación.

Estimulantes espermáticos (EE)

Los EE se clasifican en cuatro categorías:

Estimulantes de la motilidad y de la capacitación espermática

1

Hormonas

2

Enzimas

3

Otros

4

Desde las experiencias de Beavo *et al.* en 1971 sabemos que las metilxantinas, tales como la cafeína, teofilina, aminofilina y pentoxifilina, inhiben la actividad fosfodiesterasa AMPc, por lo que alguno de los procesos fisiológicos sobre los que intervienen son mediatizados por su efecto acumulador de AMPc intracelular. No obstante, el mecanismo íntimo por el cual la elevación del AMPc intracelular induce a un incremento de la motilidad espermática no está todavía claramente demostrado. En opinión de Peterson *et al.*, el AMPc estaría relacionado con el control de flujos del ion calcio a través de la membrana plasmática del espermatozoide. Ciertamente, elevaciones de los niveles de calcio intracelular parecen tener

un efecto de detrimento sobre la motilidad espermática, y el AMPc asociado a la bomba cálcica de la membrana plasmática parece ser críticamente importante en la regulación del contenido de este ion en la célula espermática. Dado el daño infligido sobre la membrana espermática durante los procesos de congelación, es posible que la bajada en la motilidad que se observa después de la descongelación esté relacionada con la inhabilidad de dicha membrana espermática dañada para el control de los niveles de calcio en el interior del espermatozoide. Somos de la opinión de Aitken *et al.*, en que las metilxantinas pueden compensar el daño espermático producido por la congelación y en definitiva la

baja motilidad espermática que presenta a la descongelación, ejerciendo un efecto protector precisamente sobre la bomba de calcio de las membranas espermáticas a través de la mediación del AMPc.

La adición directamente al semen de nucleótidos (AMPc y GMPc) también son considerados como EE en este grupo y, al igual que las metilxantinas, son considerados en la práctica clínica como potenciadores y promotores de la fecundación.

Los ionóforos de calcio eran muy utilizados en la fecundación "in vitro" como inductores de la capacitación espermática pero en la actualidad está prohibido su uso.

Estimulantes espermáticos (EE)

Los EE se clasifican en cuatro categorías:

Estimulantes de la motilidad y de la capacitación espermática

1

Hormonas

2

Enzimas

3

Otros

4

Es evidente que el transporte espermático a través del aparato genital de la hembra no se lleva a cabo exclusivamente por la propia cinética espermática sino que las contracciones uterinas son las responsables en gran medida de dicho transporte. El coito produce un efecto mecánico del pene sobre el cuello uterino que provoca descargas de oxitocina, incrementando las contracciones uterinas propulsivas, que a su vez crean diferencias de presión apareciendo el efecto "succión". Tanto el peristaltismo propulsivo como el efecto succión son responsables del transporte espermático a través del aparato genital. Por supuesto en la IA las descargas de

oxitocina son de mucha menos intensidad que en la monta natural.

En la formulación de EE se ha tenido en cuenta este hecho, y en algunas especies como la porcina está demostrado que la adición de oxitocina o carbetocina (compuesto de síntesis que presenta una mayor estabilidad uterotónica que la oxitocina, aunque la intensidad del efecto es ligeramente inferior), a las dosis seminales antes de la inseminación es un método contrastado que mejora la fertilidad al estimular las contracciones uterinas y facilitar el transporte espermático (Domínguez *et al.*, 1988, 1989, 1992, Peña *et al.*, 1997)

Se ha detectado en el plasma seminal de especies de eyaculación uterina la presencia de abundantes hormonas esteroideas tales como: testosterona, 5α -dihydrotestosterona y estrógenos conjugados y no conjugados (Claus, 1990), cuyo efecto fisiológico todavía no es muy bien conocido, pero que no cabe duda que durante la preparación de las dosis seminales para la IA se ven notablemente diluidos. Además, las hormonas esteroideas seminales estimulan la síntesis y liberación de prostaglandinas $F2\alpha$ por parte del endometrio, contribuyendo también al transporte espermático e incluso a la propia ovulación (Louanen, 1985).

Estimulantes espermáticos (EE)

Los EE se clasifican en cuatro categorías:

Estimulantes de la motilidad y de la capacitación espermática

1

Hormonas

2

Enzimas

3

Otros

4

En el año 1983 es la escuela rusa la que da el primer paso en la utilización de enzimas como potenciadores seminales. Basados en el hecho de que es necesaria una concentración adecuada de enzimas acrosómicos (hialuronidasa). La hialuronidasa es una enzima polisacarasa, componente mayoritario del

contenido acrosómico cuya finalidad es destruir el ácido hialurónico de la zona pelúcida que rodea el ovocito, facilitando la penetración espermática (invasina). Antonyuk y Bezlyudnikov (1983), en Belorusia, después de adicionar diferentes concentraciones de hialuronidasa bovina a dosis seminales porcinas, com-

prueban un incremento significativo de la fertilidad con 50 mg por dosis. Otras enzimas que también se han utilizado como EE con relativo éxito han sido la catalasa y la tripsina.

Estimulantes espermáticos (EE)

Los EE se clasifican en cuatro categorías:



Otras sustancias de diversa naturaleza experimentadas en la tecnología de EE son:

- Extractos bacterianos.
- Leucocitos.
- Albúmina sérica bovina (BSA).
- Detergentes para el control de la viscosidad.
- Carnitina.
- Arginina.
- Calicreína
- Ácido siálico
- Ácido para-aminobenzoico.
- Antioxidantes (Vitamina E, etc.).
- Etc.

Estimulantes espermáticos combinados (EEc)

Es evidente que en la formulación de estimulantes espermáticos aplicables comercialmente, lo ideal sería aprovechar conjuntamente todas y cada una de las potencialidades, principio conceptual de lo que en la actualidad hemos denominado estimulantes espermáticos “*combinados*” (EEc). Sin embargo, este es un objetivo excesivamente ambicioso y problemático, no solo por el reto que supone desde el punto de vista de la forma galénica hacer compatible su aplicación a las dosis seminales, obligando al estudio de sus posibles incompatibilidades, sino por su posible inactivación ante la presencia en el plasma seminal de enzimas que los destruyen como ocurre con los análogos de la GnRH en la IA de la coneja (Dal Bosco *et al.*, 2014).

Por otro lado, está la propia legislación que ha prohibido la utilización de hormonas estrogénicas, uno de los principales componentes de nuestro primer diseño comercial de un EEc, como fue Lechón-Plus® para la especie porcina (Domínguez, 1996, Domínguez *et al.*, 1997a), o Bovimax® para la bovina (Domínguez *et al.*, 1997b). En el año 2004 se prohibió el uso de estrógenos por parte de la CEE (Real Decreto 2178/2004, de 12 de noviembre, por el que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas de uso en la cría de ganado).

Así las cosas, durante los últimos seis años, nuestro grupo de investigación ha continuado esforzándose en la línea del diseño de un EEc de última generación aplicable a la IAP, que conjuntamente estimule la motilidad espermática, el transporte espermático y la capacidad fecundante, y por extensión la viabilidad de los embriones, asegurando unos altos niveles de fertilidad y prolificidad en el rendimiento de la IAP de las explotaciones comerciales. Recientemente se ha publicado en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial (17 abril de 2017, página 18), la solicitud de la patente correspondiente. Su composición, protegida por la patente, está basada en una serie de sustancias que aseguren la cascada fisiológica necesaria para la fecundación de la hembra desde que es inseminada. De forma y manera que manteniendo la viabilidad espermática y la estabilidad de las moléculas que aporta, permita unos resultados optimizados de la IAP, e incluso aplicable en determinadas circunstancias desfavorables como es el caso del “Síndrome de infertilidad de verano”, o la práctica de destetes muy precoces, y en general en aquellos casos de subfertilidad por causa desconocida.

Su formulación se basa en estimulantes de la motilidad espermática, agentes uterotónicos que facilitan el transporte espermático en el aparato genital de la hembra, e inductores de la ovulación con objeto de sincronizarla con la inseminación de las cerdas. Su manejo es muy sencillo, consiste en

añadir 1 mL por dosis seminal estándar tradicional (3.000×10^6 spz/ 90 mL), en el momento previo a su aplicación a la cerda en celo (≤ 15 min) (Fotografía 1). La temperatura de conservación es igual al de las dosis seminales (15°C - 17°C) lo que facilita su almacenamiento. El nombre comercial propuesto es **"SuinFort"**.

1. Pruebas de compatibilidad seminal y eficacia sobre el incremento de motilidad

Los objetivos de estas pruebas, realizadas en el Laboratorio de Espermatología de nuestro Grupo de Investigación, es comprobar el efecto que sobre la motilidad tiene el EEc diseñado, tanto en el momento de su adición, como posteriormente tras la incubación a 37°C . Determinar si dicho efecto se mantiene tanto en el semen recién procesado o varía con la conservación a 15°C durante varios días. Y por supuesto, demostrar que no tiene ningún efecto deletéreo o tóxico para los espermatozoides.

Se utilizó un sistema computarizado CASA® para medir motilidad (tanto total como progresiva) y comprobar la concentración espermática de la muestra.

Se puso una gota de $5 \mu\text{L}$ de cada muestra (semen control y adicionado con EEc) en una cámara de Makler a 37°C (alterando lo menos posible la muestra) e inmediatamente se observaron bajo el microscopio. Se analizaron todas las

muestras cada media hora, empezando nada más añadir el aditivo (tiempo 0 h), deteniendo los análisis cuando no se observaba apenas motilidad (2 a 4 horas).

Con el software ISAS®, se modificaron parámetros permitiendo así eliminar de nuestro análisis partículas que no son espermatozoides, trayectorias rotas o intercambiadas, espermatozoides inmóviles que son considerados como móviles, etc.



Fotografía 1. Adición del EEc a la dosis seminal en el momento previo a la IA de la cerda, a través del cono de acople al catéter de inseminación previamente abierto (también puede inyectarse a través del plástico de las paredes del tubo de las dosis).

Los parámetros de motilidad registrados fueron los siguientes: MOT: Motilidad total (%); PROG: Progresión (%); VCL: Velocidad según la trayectoria curvilínea ($\mu\text{m/s}$) que es la distancia recorrida a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo; VSL: Velocidad Rectilínea ($\mu\text{m/s}$) es la distancia recorrida entre el primer punto y el último de su trayectoria; VAP: Velocidad recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media ($\mu\text{m/s}$); LIN: Índice de Linealidad (%); STR: Índice de Rectitud (%); WOB: Índice de Oscilación (%); ALH media: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: Frecuencia de batido.

Paralelamente se llevó a cabo el análisis con citometría de flujo con objeto de estudiar los siguientes parámetros de calidad seminal:

- Viabilidad espermática
- Estabilidad de membrana
- Actividad mitocondrial
- Capacitación espermática
- Daño acrosómico

Con este objetivo se diluyeron las muestras de semen con PBS-BSA 0,5% y se les añadió diferentes tinciones en función de lo que queríamos medir.

Para llevar a cabo las tinciones, se pasaron 3 μl de la muestra (alrededor de 10^6 espermatozoides/ml final) a la tinción correspondiente. Una vez teñidos todos los tubos durante 15 min a 37°C , se pasaron las muestras a tubos de citometría con 300 μL PBS-BSA 0,5% alicuotados previamente y se analizaron mediante citometría de flujo (provisto de tres láseres de diodo (405 nm —violeta—, 488 nm —azul—, 635 nm —rojo—).

La mayoría de los parámetros estudiados en sistema CASA, usados para valorar la calidad seminal, mostraron diferencias significativas en cuanto al día y tiempo de incubación ($p < 0,001$), no siendo así con el tratamiento.

En cuanto a la fisiología espermática no detectamos un efecto significativo del tratamiento en las variables evaluadas por citometría, excepto para la proporción de espermatozoides con mitocondrias activas. Existen resultados significativos en la interacción de las horas de incubación y los días.

Se comprobó cómo existe un aumento en la motilidad hasta la hora y hora y media de incubación respectivamente para después disminuir en ambos grupos. El grupo EEc (SuinFort) empieza (tiempo cero) con una MOT y PROG mayor ($60,2 \pm 3,3$ y $11,2 \pm 1,5$ respectivamente), superior al grupo control ($53,7 \pm 4,1$ y $6,4 \pm 1,1$). También hay que destacar que las dosis seminales conservadas a 17°C durante 5 días

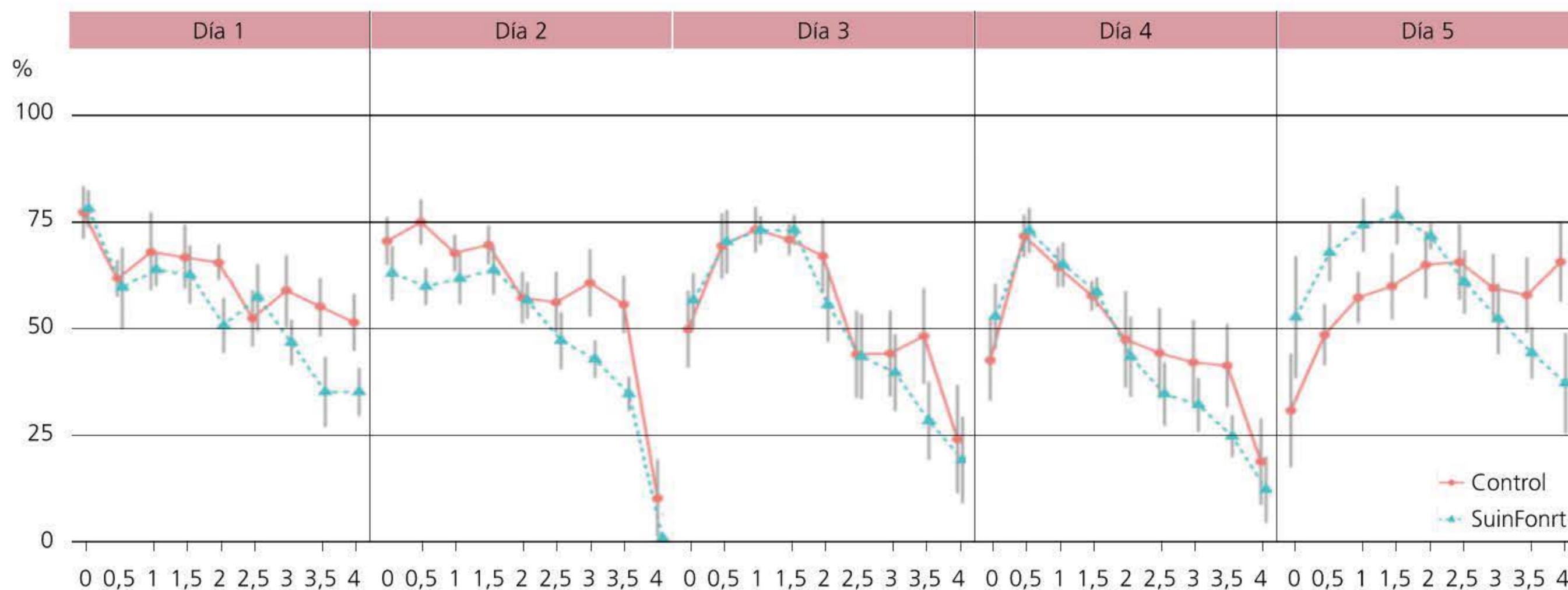
antes de ser testadas, la MOT del grupo del EEc fue superior al control hasta las 2,5 h de incubación a 37°C. (Gráfico 1)

En definitiva se concluye que el efecto estimulante del EEc sobre la motilidad se centra fundamentalmente en la primera

hora después de haber sido añadido a la dosis seminal, lo que explica el efecto beneficioso que sobre la fertilidad y prolificidad se constata en las pruebas “in vivo”. Además, teniendo en cuenta que en las dosis conservadas durante 5 días, se produ-



Gráfico 1. Evaluación de la motilidad espermática (%) en grupo control y grupo EEc (SuinFort).



ce un incremento tanto de la motilidad progresiva, linealidad y velocidad rectilínea, con respecto a los controles, induce a concluir que la pérdida de calidad seminal por efecto de la conservación es compensado por el EEc.

En cuanto a los parámetros de calidad estudiados por citometría de flujo no se encontró ninguna diferencia, estadísticamente significativa, entre el grupo control y el grupo experimental que recibía EEc, lo que demuestra que el EEc es un producto seguro y no tóxico para los espermatozoides.

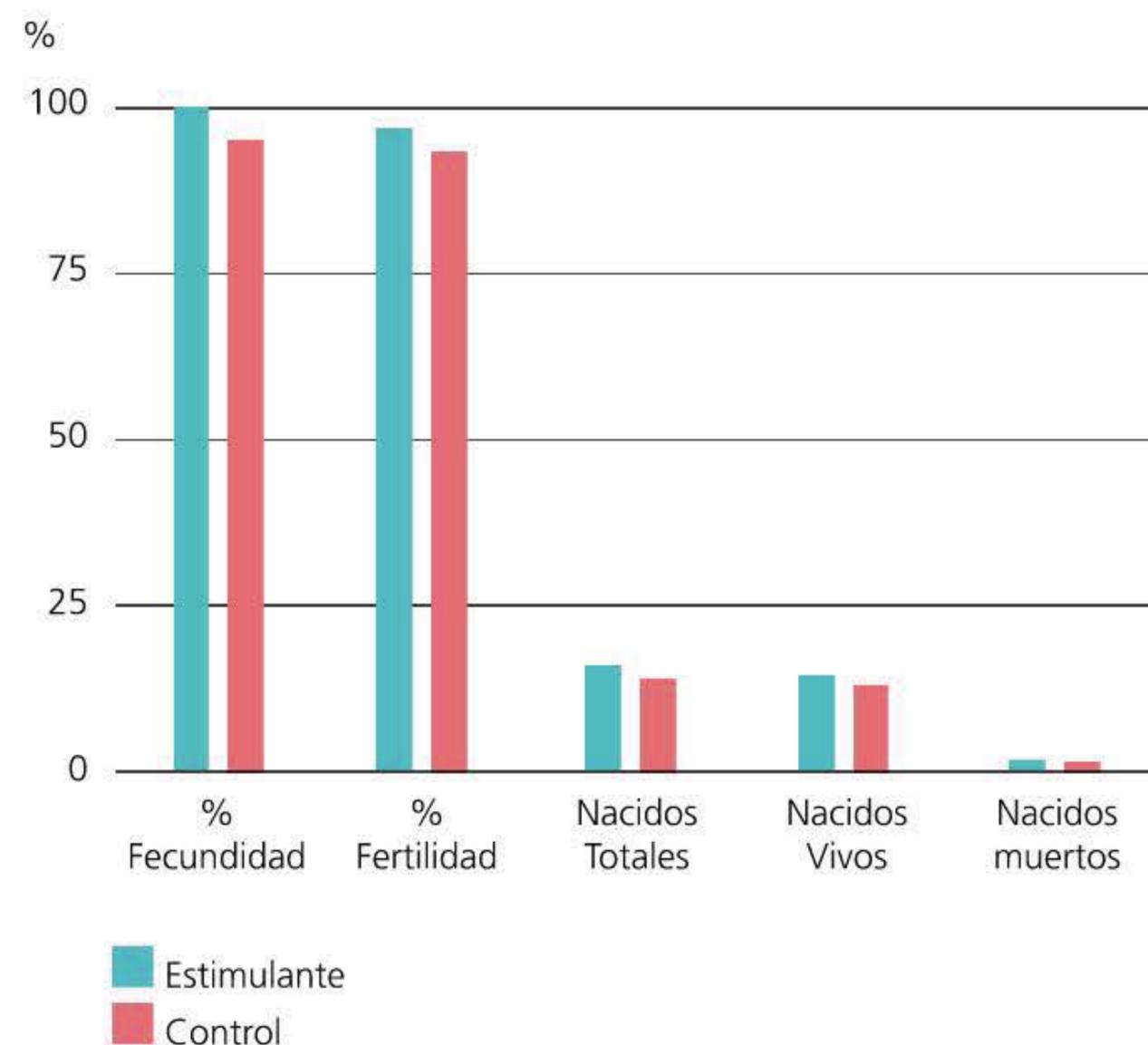
2. Prueba de campo “in vivo”, de eficacia del EEc sobre la fertilidad y prolificidad

La prueba de eficacia “in vivo” se realizó en una granja comercial porcina de Castilla y León, de 650 madres Landrace, de clasificación zootécnica de multiplicación con autoreposición para la producción de la F₁, y clasificación sanitaria A3 ESC. Durante dos años se aplicó simultáneamente el EEc a la mitad de las cerdas inseminadas, sirviendo el resto de controles. La elección de las hembras para destinarlas a cada grupo se hacía de forma randomizada, de manera que ambos grupos fueran homogéneos en cuanto a ciclo reproductivo y antecedentes reproductivos se refiere.

En el Grafico 2, se recogen los resultados globales en cuanto a fecundidad (% de hembras preñadas en el momento



Grafico 2. Efecto del EEc sobre la fecundidad (diagnóstico gestación a los 28 días de la IA), fertilidad (% partos por cerda inseminada), y prolificidad (nacidos totales, vivos y muertos)



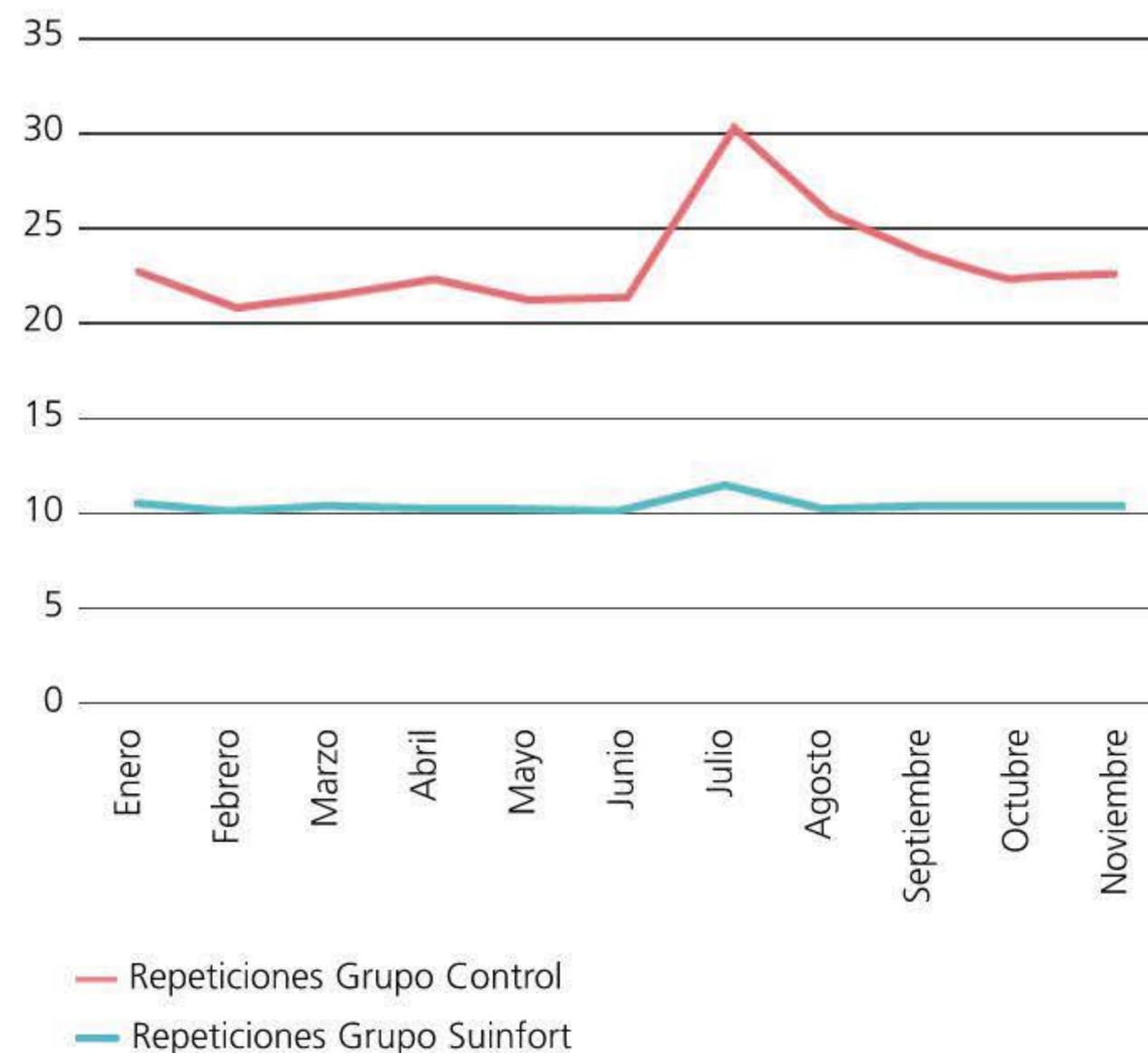
del diagnóstico de gestación a los 28 días por ecografía), y fertilidad (% de paridas), así como los parámetros de prolificidad (lechones nacidos totales por camada, nacidos vivos y nacidos muertos). Los resultados se analizaron estadísticamente por un método de ANOVA factorial, LSD Fisher y el paquete SAS.

Todos los parámetros reproductivos son favorables al EEc utilizado, siendo en el caso de la fecundidad y fertilidad al parto el incremento altamente significativo desde el punto de vista estadístico. Constatándose un lechón vivo más por camada con respecto a los controles.

En conclusión podemos decir que el EEc diseñado por nuestro grupo de investigación, proporciona unos resultados muchos más predecibles y homogéneos que los que pudieran ofrecer los componentes individualmente. Constatándose un incremento de la fertilidad de 4,4 puntos porcentuales con respecto a los controles, con carácter estadístico muy significativo, produciéndose además un incremento medio de un lechón vivo por camada. Proporcionando también una uniformidad en los resultados tanto de fertilidad como de prolificidad a lo largo de todo el año, y por supuesto controlando perfectamente la caída estacional del verano que solo se apreció en los controles (Grafico 3).



Grafico 3. Porcentajes de repeticiones al celo tras la IA a lo largo de los diferentes meses del año, en el grupo control y el grupo que recibe el EEc, donde los resultados son mucho más homogéneos y notablemente inferiores al control, sin apreciarse el efecto estacional del verano.



Bibliografía

1. ANTONYUK V.S. AND BEZLYUDNIKOV, L.G. (1983).PRIMENENIE FERMENTA GIALURONIDAZY DLYA POVYSHENIYA OPLODOTVORYAEMOSTI SVINOMATOK . ZOOTEKHNICHESKAYA NAUKA BELORUSSII: SBORNIK TRUDOV / BELORUSSKIJ NAUCHNO-ISSLEDOVATEL'SKIJ INSTITUT ZHIVOTNOVODSTVA.- MINSK, T.24.- S.51-54.
2. BEAVO, H.A.; ROGER, N.L.; GROFFORD, O.B.; BAIRD, C.F. HARDMAN, J.G.: STHERLAND, E.V. AND NEWMANN, E.V., (1971). EFFECTS OF PHOSPHODIESTERASA INHIBITORS ON CYCLIC AMP LEVELS AND ON LIPOLYSIS. ANN. N.Y. ACAD. SCI, 185 PP: 125-129.
3. BICHARD M, AND DAVID PJ. (1985). EFFECTIVENESS OF GENETIC SELECTION FOR PROLIFICACY IN PIGS. J. REPROD. FERT. SUPPL, 33: 127-138.
4. BROEKHUIJSE M, FEITSMA H, AND GADELLA B. (2012). ARTIFICIAL INSEMINATION IN PIGS: PREDICTING MALE FERTILITY. VET Q., 32(3-4): 151-157.
5. CLAUS, R. (1990) PHYSIOLOGICAL ROLE OF SEMINAL COMPONENTS IN THE REPRODUCTIVE TRACT OF THE FEMALE PIG. J. REPROD. AND FERTILITY . SUPPL40: 117-131.
6. DAL BOSCO, A.; CARDINALI, R.; BRECCHIA, G. REBOLLAR, P.G.; FATNASSI, M.; MILLÁN, P.; MATTIOLI, S. AND CASTELLINI, C. (2014). INDUCTION OF OVULATION IN RABBITS BY ADDING LICERELIN TO THE SEMINAL DOSE: IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF DIFFERENT EXCIPIENTS. ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE. NOVEMBER 10, VOL 150 ISSUES 1-2 PP: 44-49.
7. DOMÍNGUEZ, J.C. (1976). ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS PROSTAGLANDINAS F2A, E1 Y E2 SOBRE LA MOTILIDAD Y SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA DEL SEMEN DESCONGELADO DE TORO. TESIS DOCTORAL. ANALES FAC. VET. LEÓN. VOL XXII (2) PP: 485-524.
8. DOMÍNGUEZ, J.C. Y ANEL, L. (1988). ADDITION OF OXYTOCIN TO SWINE SEMEN AND ITS EFFECT NO FERTILITY AND PROLIFICITY. 11TH INTER. CONGR. ANIM. REPROD. AND A.I., DUBLIN, VOL 3 P: 239
9. DOMÍNGUEZ, J.C. ; ANEL, L. ; CARBAJO, M. Y PEÑA, F. (1989).EFECTO DE LA ADICIÓN DE OXITOCINA AL SEMEN SOBRE LA FERTILIDAD Y PROLIFICIDAD EN LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL PORCINA. ANALES FAC. VET. LEÓN. VOL XXXV PP: 113-116.
- 10.DOMÍNGUEZ, J.C. ; ANEL, L. ; CARBAJO, M. ; BOIXO, J.C. Y PEÑA, F.(1992). ADDITION OF OXYTOCIN TO SWINE SEMEN STORED DURING THREE DAYS AT 15°C AND ITS EFFECT NO FERTILITY AND PROLIFICITY. 12TH INTER. CONG. ANIM.REPROD. AND A.I. LA HAYA VOL 3 PP: 1404-1405.
- 11.DOMÍNGUEZ J.C. (1996). LECHON-PLUS®. ADITIVO SEMINAL PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL PORCINA. MONOGRAFÍA EDITADA POR PORCINOCULTURA CONTROLADA S.L. (PORCICON).
- 12.DOMÍNGUEZ, J.C. ; ALEGRE, B. Y PEÑA, F.J.(1997A) INCREMENTO DE LA FERTILIDAD Y LA PROLIFICIDAD EN LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL PORCINA CON UN ADITIVO SEMINAL (LECHON-PLUS®). I CONGR. IBÉRICO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL. ESTORIL VOL II P: 50.
- 13.DOMÍNGUEZ, J.C. ; ALEGRE, B. ; PEÑA, F.J. Y LIEGEOIS, L. (1997B) MÉTODO DE INSEMINACIÓN COMPLEMENTARIA (BOVIMAX®) EN LA MEJORA DE LA FERTILIDAD PUERPERAL EN EL GANADO VACUNO. I CONGR.IBÉRICO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL. ESTORIL. VOL I PP: 176-177.
- 14.ERIKSON BM, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. (2000). EFFECT OF FREEZING AND THAWING RATES ON THE POST-THAW VIABILITY OF BOAR SPERMATOZOA FROZEN IN FLATPACKS AND MAXI-STRAWS. ANIM. REP. SCI., 63: 205-220.

Bibliografía

- 15.GOODWIN HD. (1995). PRODUCCIÓN Y MANEJO DEL CERDO. EDITORIAL ACRIBIA. ZARAGOZA. ESPAÑA. PP. 197.
- 16.HUGHES PE. (1994). THE INFLUENCE OF BOAR LIBIDO ON THE EFFICACY OF THE BOAR EFFECT. ANIMAL REPRODUCTIONSCIENCE, 35: 111-118.
- 17.IVANOW E. (1907). DE LA FÉCONDATIONARTIFICIELLECHEZ LES MAMMIFÈRES. ARCH. SCI. BIOL., 12: 377-511.
- 18.IVANOW E. (1922). ON THE USE OF ARTIFICIAL INSEMINATION FOR ZOOTECHNICAL PURPOSES IN RUSSIA. J. AGRIC. SCI. 12, 244-256. INSEMINATED WITH FROZEN SEMEN. J. ANIM. SCI., 51: 911-916.
- 19.JOHNSON L. (1998). CURRENT DEVELOPMENTS IN SWINE SEMEN: PRESERVATIONS, ARTIFICIAL INSEMINATION AND SPERM SEXING. PROC IPVS, 1: 225-229.
- 20.JOUANEN, A. ; SAINTOT, M. ; THALER-DAO, H. AND CRASTER DE PAULET, A.(1985). PROSTAGLANDIN SYNTHESIS FROM ENDOGENOUS AND EXOGENOUS ARACHIDONIC ACID IN THE RAT UTERUS. EFFECT OF ESTRADIOL AND PROGESTERONE. PROSTAGLANDINS LEUKOTRIENES MED. 18 PP: 321-336.
- 21.KNOX R. (2016). ARTIFICIAL INSEMINATION IN PIG TODAY. THERIOGNOLOGY,85(1): 83-93
- 22.LEVIS D. (2000). LIQUID BOAR SEMEN PRODUCTION: CURRENT EXTENDER TECHNOLOGY AND WHERE WE GO FROM HERE. EN: JOHNSON LA, GUTHRIE HD. BOAR SEMEN PRESERVATION IV. LAWRENCE, KS: ALLEN PRESS; P. 121-128.
- 23.MILOVANOV, V.K., CITADO POR PEREZ Y PEREZ, F. EN: "REPRODUCCIÓN ANIMAL: INSEMINACIÓN ARTIFICIAL Y TRASPLANTE DE EMBRIONES". EDITORIAL CIENTÍFICO-MÉDICA. BARCELONA. (1985) P 217.
- 24.NGULA J. (2015). DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS DE MANEJO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL PARA EL CONTROL DE LA INFERTILIDAD ESTACIONAL EN EL GANADO PORCINO. TESIS DOCTORAL. UNIVERSIDAD DE LEÓN, LEÓN.
- 25.PETERSON, R.H. ; SEYLER, D. ; BUNDMAN, D. AND FREUND, M. (1979). THE EFFECT OF THEOPHILINE AND DIBUTYRYL CYCLIC AMP ON THE UPTAKE OF RADIOACTIVE CALCIUM AND PHOSPHATE IONS BY BOAR AND HUMAN SPERMATOZOA. J. REPROD. AND FERTILITY , 55 PP: 385-390.
- 26.PEÑA, F.J. ; DOMÍNGUEZ, J.C. ; ANEL, L. ; CARBAJO, M. Y ALEGRE, B.(1997).TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DE INFERTILIDAD ESTACIONAL DEL GANADO PORCINO POR MEDIO DE ADITIVOS SEMINALES: EFECTO DE LA OXITOCINA. I CONGR. IBÉRICO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL. ESTORIL VOL II PP: 306-310.
- 27.ROCA J, PARRILLA I, RODRIGUEZ-MARTINEZ H, GIL MA, CUELLO C, VÁZQUEZ JM, MARTÍNEZ EA. (2011): APPROACHES TOWARDS EFFICIENT USE OF BOAR SEMEN IN THE PIG INDUSTRY. REPROD DOMEST ANIM., 46(2): 79-83.
- 28.ROCA J, BROEKHUIJSE MLWJ, PARRILLA I, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H, MARTÍNEZ E, BOLARIN A., (2015) BOAR DIFFERENCES IN ARTIFICIAL INSEMINATION OUTCOMES: CAN EY BE MINIMIZED? REPROD. DOM. ANIM., 50 (2):48-55 [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1111/RDA.12530](http://dx.doi.org/10.1111/RDA.12530)
- 29.ROCA J, PARRILLA I, BOLARIN A, MARTINEZ E, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. (2016). WILL AI IN PIGS BECOME MORE EFFICIENT?. THERIOGENOLOGY, 86(1), 187-193