



universidad
de León



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**EFFECTOS DE UN TRATAMIENTO
ANTIBACTERIANO SIN ANTIBIÓTICOS
SOBRE LA CALIDAD DE LAS DOSIS
SEMINALES DE CERDO**

**EFFECTS OF AN ANTIBACTERIAL
TREATMENT WITHOUT ANTIBIOTICS
ON THE QUALITY OF THE SEMINAL
DOSES OF THE PIG**

Autor: Nerea Sorarrain de Pedro

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Junio, 2020

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Industria porcina	1
1.2.	La inseminación artificial en la ganadería porcina	1
1.3.	Uso de antibióticos	4
1.4.	Centrifugación en coloide en una sola capa (SLC)	5
1.5.	Evaluación de la calidad de los espermatozoides	7
1.5.1.	<i>Evaluación de la motilidad</i>	8
1.5.2.	<i>Evaluación de la cromatina espermática</i>	9
2.	OBJETIVO.....	11
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1.	Diseño experimental	12
3.2.	Reactivos y medios utilizados	12
3.3.	Preparación de las muestras	13
3.3.1.	<i>Obtención de las muestras espermáticas</i>	13
3.3.2.	<i>Preparación de las dosis seminales en el laboratorio</i>	14
3.3.3.	<i>Realización de SLC de las muestras</i>	14
3.4.	Análisis espermático	14
3.4.1.	<i>Evaluación de la motilidad espermática</i>	14
3.4.2.	<i>Evaluación de la cromatina espermática mediante SCSA</i>	16
3.5.	Análisis estadístico	17
4.	RESULTADOS	19
4.1.	Movilidad espermática	19
4.2.	Cromatina espermática	23
5.	DISCUSIÓN.....	25
6.	CONCLUSIONES.....	28
7.	REFERENCIAS	29

Resumen

Para controlar el crecimiento de las bacterias, se suelen agregar antibióticos a los diluyentes seminales. Sin embargo, el uso excesivo de antibióticos puede conducir al desarrollo de resistencias microbianas, por lo que se han desarrollado técnicas alternativas como la centrifugación en coloide en una sola capa (SLC) con Porcicoll. El objetivo de este estudio fue comprobar si el procesamiento de grandes volúmenes de muestras seminales mediante la SLC con Porcicoll al 20% y al 30 %, utilizada para eliminar las bacterias, permite mantener la calidad de los espermatozoides de cerdo. Se llevaron a cabo análisis de la movilidad (CASA) y de la fragmentación de la cromatina (SCSA) de muestras control, procesadas mediante SLC con Porcicoll al 20% y procesadas mediante SLC con Porcicoll al 30% en los días 0, 3 y 7 del experimento, contados a partir de la recogida de las muestras. Los resultados obtenidos muestran que los parámetros MOT y PROG varían significativamente a favor de los controles en el día 0 ($P < 0,001$ y $P = 0,023$) y a favor de las muestras SLC en el día 7 ($P = 0,047$). Los datos también muestran que el %HDS es significativamente menor en las muestras SLC en el día 0 ($P = 0,005$ y $P = 0,009$). A la vista de los resultados obtenidos en el presente estudio podemos afirmar que el coloide Porcicoll resulta efectivo para eliminar la mayoría de las bacterias en el semen porcino a la vez que, no sólo no deteriora la calidad de las muestras, sino que las mantiene mejor, y todo esto utilizando grandes volúmenes de muestra, por lo que puede ser llevado a la práctica.

Palabras clave: SLC, Porcicoll, antimicrobiano, espermatozoides, movilidad espermática, cromatina espermática.

Abstract

To control the growth of bacteria, antibiotics are often added to semen extenders. However, the excessive use of antibiotics can lead to the development of antibiotic-resistance by bacteria, which is why alternative techniques such as Single Layer Centrifugation (SLC) with Porcicoll have been developed. The objective of this study was to check whether the processing of large volumes of seminal samples by means of the SLC with 20% and 30% Porcicoll, used to eliminate bacteria, allows the quality of the pig sperm to be maintained. Motility analysis (CASA) and chromatin fragmentation analysis (SCSA) were carried out on control samples, samples processed by SLC with 20% Porcicoll and samples processed by SLC with 30% Porcicoll on days 0, 3 and 7 of the experiment, counted from the collection of the samples. The results obtained show that the MOT and PROG parameters vary significantly in favor of the controls on day 0 ($P < 0.001$ and $P = 0.023$) and in favor of the SLC samples on day 7 ($P = 0.047$). The data also shows that % HDS is significantly lower in SLC samples on day 0 ($P = 0.005$ and $P = 0.009$). In view of the results obtained in the present study, we can affirm that the Porcicoll colloid is effective in eliminating most of the bacteria in porcine semen, while not only doesn't it deteriorate the quality of the samples, but it also helps them keep better, and all this using large volumes of sample, so it can be put into practice.

Keywords: SLC, Porcicoll, antimicrobial, spermatozoa, sperm motility, sperm chromatin.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Industria porcina

La industria porcina es una actividad dinámica y económicamente relevante a nivel mundial (Crespo-Félez *et al.*, 2017). Concretamente en España, el sector porcino tiene una importancia clave en la economía, ya que supone en torno al 14% de la Producción Final Agraria. Este sector ocupa el primer lugar en cuanto a importancia económica dentro de las producciones ganaderas alcanzando cerca del 39% de la Producción Final Ganadera. España es la cuarta potencia productora, después de China, EEUU, y Alemania. Durante los últimos años el sector porcino ha crecido notablemente, tanto en producción, como en censos y en número de explotaciones (Ministerio de Agricultura, no date).

El aumento continuo de las tasas de producción y las demandas de consumo de carne de cerdo en todo el mundo implican la necesidad de una producción sostenible y altamente eficiente en un entorno compatible con el ganado, así como la conservación de la competitividad. En este contexto, el aumento del progreso genético de la población porcina para producir más y mejor carne con menos animales criados es fundamental para disminuir la presión ambiental. Las tecnologías reproductivas, principalmente la inseminación artificial (IA) y la transferencia de embriones, son los mejores medios para promover el progreso genético y, por lo tanto, mejorar las poblaciones porcinas mundiales (Roca *et al.*, 2016).

1.2. La inseminación artificial en la ganadería porcina

La finalidad de la reproducción asistida es la consecución de un embarazo y la obtención de crías viables por un medio diferente al apareamiento natural. La forma más utilizada de reproducción asistida en animales es la inseminación artificial (IA). La fecundación *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) se limitan a laboratorios especializados o se usan ocasionalmente para investigación o para la conservación de razas o especies de alto valor genético o en peligro (Morrell, 2016).

La IA consiste en la colocación de espermatozoides en el tracto genital femenino utilizando medios artificiales y es la tecnología de reproducción más antigua utilizada en animales de granja. A pesar de su antigüedad, la IA sigue siendo la tecnología de reproducción más aplicada en todo el mundo. La razón principal para la aplicación de la IA a esta importante industria es acelerar la tasa de mejora genética. Esto se logra transfiriendo el potencial genético de los mejores machos a una gran cantidad de hembras (Roca *et al.*, 2006).

La IA ha sido una herramienta exitosa de manejo reproductivo para mejorar la eficiencia de la producción ganadera. En porcino, los registros mostraron ya en 1990 que las tasas de reproducción alcanzaron un porcentaje de partos de entre el 80% y 90% gracias a la inseminación artificial, y el tamaño de la camada obtenido era de entre 11 y 13 cerdos, llegando al 86% de partos y 14 cerdos por camada en 2014. El nivel de fertilidad alcanzado con la IA, a pesar de la considerable variación entre países y granjas, se consiguió gracias a una tecnología para la producción de dosis seminales de alta fertilidad y a la posibilidad de monitorizar la IA mediante el control de calidad y el rendimiento reproductivo (Knox, 2016).

El uso de semen a bajas concentraciones por dosis de IA puede permitir una mayor eficiencia con un impacto genético significativo. A medida que la IA continúa siendo más eficiente, se vuelve más importante identificar a los machos menos fértiles. Por lo tanto, la identificación y el sacrificio de los machos que producen un eyaculado menos fértil les permite a los productores de ganado la oportunidad de mejorar la eficiencia reproductiva general (Didion *et al.*, 2009).

La principal ventaja que ofrece la IA en cerdos es la posibilidad de inseminar muchas hembras con un solo macho sin necesidad de mover a los animales ni tener que esperar a que el macho cubra a las hembras. Asimismo, la IA permite la minimización de la entrada de enfermedades en la piara a través de animales vivos (dado que se evita el contacto entre macho y hembra durante el apareamiento) y la incorporación de mejoras genéticas. El uso de IA también promueve una gran eficiencia de trabajo (debido a la dilución del semen) y permite el acceso al uso de nuevas tecnologías como la utilización de semen congelado y de semen sexado (Knox, 2016).

Esta técnica se practica en todo el mundo y es la biotecnología más aplicada y efectiva en la reproducción porcina, como se puede observar en las estadísticas de producción porcina de la tabla 1 (Waberski *et al.*, 2019). A pesar de los grandes avances en la tecnología de semen congelado, la preservación en líquido (semen refrigerado) continúa siendo el método principal para estabilizar el semen de cerdo hasta la inseminación. En los países de Europa Occidental, más del 70% de las granjas porcinas realizan IA utilizando semen refrigerado (Shimada *et al.*, 2016).

Tabla 1: Estadísticas de producción porcina en los 10 principales países productores de carne de cerdo (Waberski *et al.*, 2019).

	Producción de cerdo 2018 (en 1.000 toneladas métricas)	Porción estimada de IA (de la cría total)
China	54.650	40%
UE	24.050	95%
EEUU	12.166	90%
Brasil	3.675	95%
Rusia	3.050	85%
Vietnam	2.800	90%
Canadá	2.015	>95%
Filipinas	1.600	85%
Corea del sur	1.321	90%
México	1.305	90%

El uso comercial de semen congelado para la IA del ganado vacuno fue un éxito en la década de 1950, y sirvió como modelo para la industria porcina. Sin embargo, aunque la IA del cerdo con semen refrigerado aumentó a medida que se desarrollaron nuevos diluyentes seminales, la criopreservación no se logró hasta 1971-75 (Waberski *et al.*, 2019). Idealmente, los programas de IA porcina deberían usar semen congelado debido a sus ventajas adicionales en comparación con el semen refrigerado, en particular las relacionadas con el comercio internacional y la bioseguridad (Martinez-Alborcia *et al.*, 2013). El semen de cerdo congelado se valora por mantener la genética porcina para permitir la preservación y regeneración de líneas genéticas valiosas, proporcionar un suministro de semen de emergencia y facilitar las oportunidades para la distribución global de genes (Spencer *et al.*, 2010). Sin embargo, el semen congelado no se usa rutinariamente, puesto que se limitan a los casos en que se desea la transferencia de material genético de alto valor entre cerdos debido a la eficiencia relativamente baja de los protocolos de criopreservación. Actualmente, sólo una pequeña proporción de espermatozoides sobreviven a la congelación y aquellos que sí lo hacen tienen una vida útil reducida, lo que resulta en una fertilidad más baja que la del semen refrigerado después de la IA (Martinez-Alborcia *et al.*, 2013).

El procedimiento de IA más utilizado en granjas porcinas hoy en día involucra el uso de semen refrigerado (almacenado durante 3-5 días entre 15 °C y 17 °C) y la deposición cervical de grandes cantidades de espermatozoides por cerda en celo. Generalmente suelen realizarse 2-3 IA por cerda en estro usando $2-3 \times 10^9$ espermatozoides por dosis de IA. Este procedimiento de IA es efectivo, ya que produce los mismos resultados de fertilidad que por apareamiento natural, pero es mejorable, debido a que la rentabilidad de los cerdos genéticamente más valiosos está limitada, dado que no se inseminan anualmente más de 2000 cerdas por cerdo reproductivo.

Además, la mayoría de las dosis de IA utilizadas comercialmente se derivan de grupos de semen de varios (generalmente tres) verracos en lugar de un solo verraco, un procedimiento que dificulta el progreso genético (Roca *et al.*, 2016). Debido a que este proceso es mejorable, se han buscado metodologías para optimizar los procedimientos y seleccionar los mejores espermatozoides para inseminar a las cerdas.

1.3. Uso de antibióticos

La aparición de bacterias resistentes a los antibióticos está llevando a una crisis en la atención médica, con personas que contraen infecciones bacterianas que son difíciles o, en algunos casos, imposibles de tratar con antibióticos. Por lo tanto, ahora se está haciendo un esfuerzo para restringir el uso de antibióticos a solo aquellos con fines terapéuticos (Morrell y Wallgren, 2011).

Un uso no terapéutico de los antibióticos es la adición de estos a los diluyentes seminales cuando se preparan dosis de semen para IA. El eyaculado se contamina durante la recolección de semen por la microbiota del tracto reproductivo y del medio ambiente. Dado que el semen generalmente se almacena durante varios días antes de la IA en un medio rico en nutrientes para mantener la supervivencia de los espermatozoides, las bacterias pueden multiplicarse incluso a la temperatura de almacenamiento normal del semen de cerdo (15-17°C). Se agregan antibióticos para prevenir el deterioro inducido por bacterias en la calidad de los espermatozoides (porque compiten con los espermatozoides por nutrientes y producen subproductos metabólicos tóxicos) y la posibilidad de causar enfermedades en las hembras inseminadas. Sin embargo, ahora se cuestiona la eficacia de los antibióticos contra los microorganismos que comúnmente contaminan el semen, ya que se han detectado bacterias en el semen de cerdo a pesar de la presencia de antibióticos (Morrell *et al.*, 2019). Esto se ha relacionado con el desarrollo de resistencias a los antibióticos por parte de las bacterias que se ha mencionado anteriormente.

Una alternativa a la adición de antibióticos a los diluyentes de semen sería eliminar las bacterias contaminantes por medios físicos inmediatamente después de la recolección del semen. Una nueva técnica de preparación de esperma, conocida como la centrifugación en coloide en una sola capa (SLC: Single Layer Centrifugation) utilizando formulaciones coloidales específicas para cada especie, desarrollada por la Dra. Jane Morrell de la Universidad de Ciencias Agrícolas de Suecia, selecciona la subpoblación de espermatozoides que es altamente móvil, con morfología normal y buena integridad de la cromatina, del resto del eyaculado. Se demostró

que la técnica SLC reduce la contaminación bacteriana en muestras de semen de cerdo y caballo en el laboratorio (Morrell *et al.*, 2019).

1.4. Centrifugación en coloide en una sola capa (SLC)

El eyaculado consiste en una población heterogénea de espermatozoides normales y anormales en diversas etapas de madurez. El tracto reproductivo femenino proporciona una serie de mecanismos de selección espermática para garantizar que solo los espermatozoides aptos lleguen al sitio de fecundación potencial en los oviductos. Estos espermatozoides deben ser móviles, morfológicamente normales, capaces de capacitarse mientras están en los depósitos de esperma y capaces de experimentar la reacción del acrosoma (Sjunnesson *et al.*, 2013). Durante la IA, se deposita un número reducido de espermatozoides en el tracto reproductor femenino en comparación con el apareamiento natural. Por lo tanto, la buena calidad de los espermatozoides es de suma importancia para garantizar que suficientes espermatozoides con capacidad de fecundación lleguen al ovocito (Morrell, 2019).

Adicionalmente, el almacenamiento o la criopreservación de los espermatozoides antes de su uso en la IA provocan la formación de restos celulares y espermatozoides muertos o moribundos, lo cual tiene efectos perjudiciales sobre los demás espermatozoides. Cuando se está utilizando muestras de baja calidad para llevar a cabo una IA es probable que no haya suficientes espermatozoides disponibles para poblar los reservorios de esperma (que es como se conoce el istmo del oviducto). De igual modo, debido a la gran cantidad de espermatozoides de baja calidad, los mecanismos de selección pueden verse sobrepasados, permitiendo la fecundación del ovocito por un espermatozoide anormal, provocando un posterior fracaso en el desarrollo del embrión (Morrell, 2019). Por consiguiente, en un intento de seleccionar los mejores espermatozoides en un eyaculado, se han desarrollado varias estrategias *in vitro* para procesar los espermatozoides para su uso en la reproducción asistida (Sjunnesson *et al.*, 2013).

Existen muchas diferencias entre las especies con respecto al número de espermatozoides necesarios para la IA, el tipo de semen utilizado (fresco, almacenado o criopreservado), el momento relativo a la ovulación y el sitio de depósito del semen. Estas diferencias crean una variedad de desafíos para la preparación del semen de acuerdo con la especie en cuestión. A pesar de las diferencias, una característica común a todas las especies es que la posibilidad de un resultado exitoso, es decir, un embarazo, está relacionada con la calidad de la muestra de semen utilizada (Morrell, 2016).

La selección de espermatozoides en el laboratorio es un proceso que permite que los espermatozoides con las características más deseables se separen del resto del eyaculado, mejorando así las posibilidades de fecundación. La centrifugación en coloide es uno de esos métodos de selección (Morrell, 2019).

Durante la centrifugación suave de semen extendido fresco a través de un coloide, los espermatozoides móviles se alinean en la dirección de la fuerza centrífuga y se mueven de la muestra al coloide donde pasan entre las partículas de sílice recubiertas. Los espermatozoides morfológicamente normales y aquellos con plasma intacto y membranas acrosómicas pasan más fácilmente a través del coloide que aquellos que son morfológicamente anormales, tienen membranas dañadas o un acrosoma que ya ha reaccionado. Por lo tanto, el pellet contiene un predominio de espermatozoides móviles, morfológicamente normales con membranas intactas. Además, los espermatozoides con cromatina altamente condensada pasan a través del coloide, mientras que aquellos con cromatina inmadura o no condensada tienden a permanecer en la interfaz semen/coloide. De la misma manera, durante la SLC, los espermatozoides se separan del plasma seminal, puesto que este último se retiene por encima del coloide en el sobrenadante y los espermatozoides se quedan en el pellet (Morrell, 2019).

La centrifugación en coloide (DGC: Density Gradient Centrifugation) separa los espermatozoides del plasma seminal y selecciona los espermatozoides con mejor motilidad, morfología, viabilidad e integridad de su cromatina. Sin embargo, la aplicación generalizada de la técnica DGC en el procesamiento de espermatozoides de animales se ha visto obstaculizada por la falta de formulaciones coloidales específicas para cada animal y la dificultad de procesar suficientes espermatozoides para las grandes dosis de inseminación requeridas en animales domésticos (Morrell *et al.*, 2009).

La centrifugación en coloide en una sola capa (SLC: Single Layer Centrifugation) ha surgido como un método alternativo a otras técnicas, proporcionando varias ventajas, tales como formulaciones específicas para cada especie listas para usar, homogeneidad entre lotes de coloide, y la posibilidad de aumentar la escala para procesar eyaculados de gran volumen (como es el caso del verraco y el caballo), lo que puede facilitar su aplicación en la preparación de semen con fines comerciales (Sjunnesson *et al.*, 2013). Esta técnica, al igual que la DGC, permite seleccionar una subpoblación de espermatozoides que es altamente móvil, con morfología normal y buena integridad de la cromatina. Es probable que estos espermatozoides

sean funcionales, puedan fecundar y activar los ovocitos y contribuir al desarrollo futuro del cigoto (Morrell, 2016).

Como se ha comentado anteriormente, la SLC separa los espermatozoides del plasma seminal, que contiene las bacterias, permitiendo así una reducción de la contaminación bacteriana en las muestras para la IA. Esto permite reducir a su vez el uso de los antibióticos, manteniendo la calidad de los espermatozoides separados.

Rutinariamente, la SLC convencional se suele realizar en tubos de 50 ml. Dado que la fracción rica en espermatozoides del eyaculado de verraco puede superar los 100 ml, se requeriría un número excesivo de tubos para procesar toda la muestra mediante SLC convencional. Sin embargo, el desarrollo de los coloides específicos de especie basados en sílice recubierto de silano (Morrell *et al.*, 2009) como el Porcicoll en el caso del cerdo (sílice recubierta con glicidoxipropiltrimetoxisilano en una solución salina tamponada) ha permitido la ampliación de los volúmenes procesados hasta los 150 ml (Martinez-Alborcia *et al.*, 2013).

En resumen, la SLC con Porcicoll ha demostrado la separación de espermatozoides de gran calidad de los de menor calidad y del plasma seminal (que contiene a su vez las bacterias) permitiendo el procesamiento de grandes volúmenes. Así pues, permite una reducción del número de espermatozoides en las dosis de inseminación, el aumento de la vida útil del semen preservado, la eliminación de los patógenos, la conservación de razas raras o especies en peligro de extinción, etc.

1.5. Evaluación de la calidad de los espermatozoides

La calidad del semen es un término utilizado para describir la probabilidad de que los espermatozoides en una muestra sean funcionales, ya sea cuando se usa en reproducción asistida o si el macho se usa para el apareamiento natural. Para que los espermatozoides lleguen al ovocito, necesitan moverse desde el sitio de deposición de semen (generalmente en la vagina o el útero) a través del tracto reproductivo inferior hasta la unión del útero-oviducto donde forman un reservorio temporal. Por lo tanto, deben poseer una motilidad progresiva para evitar la pérdida en el tracto reproductivo femenino por el reflujo. También deben tener una cabeza con morfología normal, una ausencia de obstáculos para el libre movimiento de la cola, una membrana plasmática intacta y un acrosoma sin reaccionar. Se necesita un suministro de energía para el movimiento, que es suministrado por mitocondrias funcionales en la parte media, y ADN altamente condensado, transcripcionalmente silencioso (Morrell, 2019).

Una vez en los oviductos, deben poder realizar la capacitación, que consiste en una serie de cambios en la membrana que implican la redistribución de sustancias como el colesterol y también la entrada de iones como el calcio y el bicarbonato. Consecuentemente, el patrón de movimiento cambia de motilidad progresiva al denominado patrón de motilidad hiperactivada. Estos procesos también implican el consumo de energía y, por lo tanto, requieren mitocondrias que funcionen normalmente. A continuación, los espermatozoides de alta calidad deben localizar el ovocito, realizar la reacción acrosómica y unirse a la zona pelúcida. Finalmente, la cabeza del espermatozoide penetra en el ovocito y lo activa (Morrell, 2019).

Después de la fecundación, el ADN paterno debe estar intacto y ser capaz de descondensarse de su forma compactada para permitir la formación del pronúcleo masculino, que tras su combinación con el femenino generará un cigoto viable.

En esta ocasión, para determinar la calidad de los espermatozoides se evaluará la motilidad de estos y la integridad de la cromatina mediante la técnica de análisis de la estructura de la cromatina espermática (SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay).

1.5.1. Evaluación de la motilidad

La motilidad de los espermatozoides es uno de los parámetros más significativos en la predicción de la fertilidad masculina. Se trata de uno de los parámetros evaluados rutinariamente en los análisis de calidad espermática (Soler *et al.*, 2018).

Existen múltiples formas de determinar la motilidad espermática. La técnica utilizada en el presente estudio es el análisis de semen computarizado (CASA: Computer-Assisted Sperm Analysis). El uso de los sistemas CASA permite una medición objetiva de muchos parámetros de la movilidad de semen, ofreciendo observaciones más confiables, imparciales y repetibles, respecto al examen visual (Bompart *et al.*, 2018).

Un sistema CASA necesita una cámara de video conectada a un microscopio de contraste de fases y un ordenador que cuente con un software CASA instalado. La cámara manda la imagen del microscopio al ordenador, donde un analizador digital de imagen, captura varias fotografías. El software diferencia los espermatozoides de otras partículas o elementos que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria de cada espermatozoide durante ese tiempo (Mortimer *et al.*, 2015). El programa determina varios parámetros en relación a la motilidad gracias a los cuales se puede evaluar la calidad de la muestra. El programa clasifica de esta forma los espermatozoides en estáticos y móviles, y estos últimos los clasifica según su trayectoria en progresivos o no progresivos.

Al final del proceso, el sistema CASA facilita una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria realizada por cada espermatozoide individual, permitiendo obtener información sobre el porcentaje de células móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento.

1.5.2. Evaluación de la cromatina espermática

El ADN en el núcleo espermático está en una forma altamente condensada denominada cromatina, que se compacta a medida que los espermatozoides maduran. Aquellos con cromatina dañada pueden tener una morfología normal, buena motilidad y membranas intactas, y por lo tanto pueden competir con los espermatozoides con cromatina intacta para fecundar el ovocito. Dado que el ovocito tiene mecanismos de reparación de ADN limitados, la fecundación por un espermatozoide con ADN dañado puede conducir al fracaso en el desarrollo del embrión en algún momento. Aunque la proporción de espermatozoides de cerdo con cromatina dañada es generalmente mucho más baja que en otras especies, puede aumentar considerablemente por el almacenamiento o por la crioconservación (Morrell, 2019).

Varios estudios han demostrado que el ADN dañado en los espermatozoides (causado por el aumento de la fragmentación, por ejemplo) se asocia con una disminución de la fertilidad, con problemas en la salud de la descendencia, con abortos o con anomalías fetales (Martínez-Pastor *et al.*, 2010). Es por ello que hay varias características de los espermatozoides y de su entorno que sirven para proteger la integridad de su cromatina. La última de dichas barreras de protección es la naturaleza altamente compactada de la cromatina en los núcleos de los espermatozoides (Zubkova *et al.*, 2005).

Una amplia gama de factores internos y externos, como la maduración anormal del esperma, la apoptosis abortiva de las células germinales, el estrés oxidativo, los métodos de manejo del semen, los estreses ambientales, la edad y las infecciones bacterianas pueden provocar la fragmentación del ADN espermático (Khezri *et al.*, 2019).

Entre la gran variedad de pruebas disponibles para evaluar el daño del ADN espermático, el análisis de la estructura de la cromatina espermática (SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay) desarrollado por Evenson *et al.* (1999) es el más ampliamente estudiado. SCSA se describe como un método confiable y rápido con buena predicción de la fertilidad (Hosseiniifar *et al.*, 2015).

El SCSA permite obtener información sobre el estado de la cromatina espermática y su consecuente impacto en la fertilidad masculina mediante citometría de flujo (Didion *et al.*,

2009). Esta prueba utiliza una solución de naranja de acridina (AO: Acridine Orange), el cual es un fluorocromo metacromático que se intercala fácilmente en el ADN. Cuando se asocia a ADN bicatenario (ADNs), emite fluorescencia en verde, mientras que emite fluorescencia en rojo cuando se asocia a ADN monocatenario (ADNs). Esta técnica requiere un paso de desnaturalización que induce la formación de ADNs a partir de zonas con roturas. Por lo tanto, cada núcleo espermático produce una mezcla de fluorescencia verde y roja cuando se excita con un láser de 488 nm, dependiendo de la fragmentación del ADN y la susceptibilidad de la cromatina a la desnaturalización. Los datos se procesan para obtener, para cada espermatozoide, la relación $[\text{fluorescencia roja}]/[\text{fluorescencia total}]$, llamada índice de fragmentación del ADN (DFI: DNA Fragmentation Index) (Martínez-Pastor *et al.*, 2010). A partir de los datos obtenidos del SCSA también se obtiene el % HDS (High DNA Stainability), que es el % de espermatozoides con fluorescencia verde aumentada y nos da información sobre el grado de descondensación de la cromatina. Así como los parámetros relacionados con el DFI están relacionados con una peor condición de la cromatina, el %HDS es característico de espermatozoides inmaduros (Evenson, 2011).

El DFI representa los espermatozoides que tienen cromatina vulnerable al calor o a la desnaturalización ácida. A partir del DFI se pueden extraer los valores x-DFI (mean DFI), SD-DFI (Standard Desviation of the DFI) y % DFI (también llamado t-DFI). El x-DFI será el valor medio del DFI de una muestra y el SD-DFI la desviación estándar del DFI, el cual además está relacionado con la heterogeneidad de la muestra. La desviación estándar del DFI mide el grado de anormalidad en la estructura de la cromatina dentro de una población, y la media del DFI describe los cambios y las tendencias en toda la población de células. A mayores, tendremos otros dos parámetros más, el DFI mayor del 25% y menor del 50% corresponderá al m-DFI (médium DFI), mientras que si el DFI es mayor del 50% será el h-DFI (high DFI) (Evenson *et al.*, 2002).

El % DFI es el porcentaje de espermatozoides en la muestra de semen con ADN fragmentado (Didion *et al.*, 2009). El % DFI suele calcularse a partir de los espermatozoides con niveles moderados y altos de fragmentación, esto es, mediante la suma del m-DFI y el h-DFI. Un % DFI alto se ha relacionado con una fertilidad reducida, tiempos más largos de embarazo y mayores tasas de aborto espontáneo en humanos (Martínez-Pastor *et al.*, 2010), y ha demostrado una disminución de la fertilidad y la prolificidad en los animales domésticos como los cerdos (Boe-Hansen *et al.*, 2008).

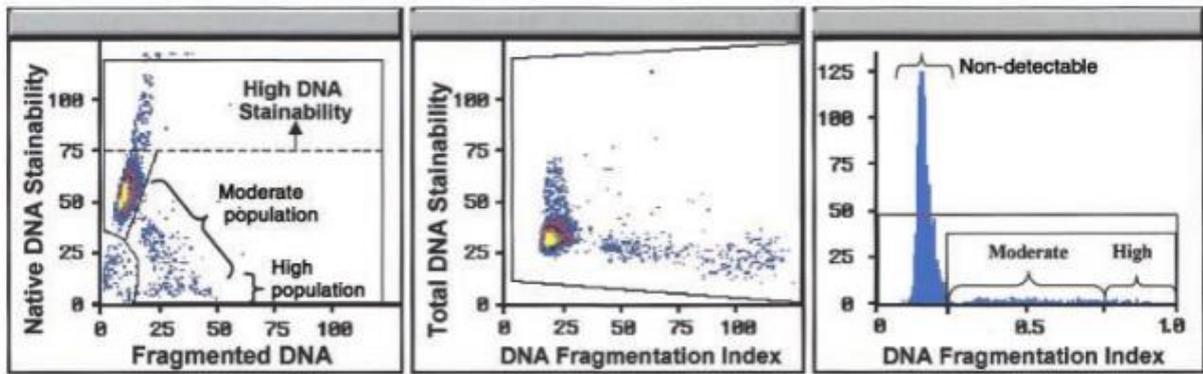


Figura 1: Ejemplo de gráficos obtenidos de resultados de SCSA. El citograma de la izquierda muestra el ADN fragmentado (fluorescencia roja) frente a ADN estable (fluorescencia verde). Se puede visualizar dónde se encuentra cada parte constituyente del ADN fragmentado (no detectable, moderada, alta) y el HDS. El citograma central muestra el DFI (fluorescencia roja respecto a fluorescencia total) frente a la fluorescencia total (fluorescencia roja y verde). El histograma de la derecha muestra el índice de fragmentación del ADN con cada subpoblación claramente marcada (no detectable, moderado y alto) (Evenson *et al.*, 2002).

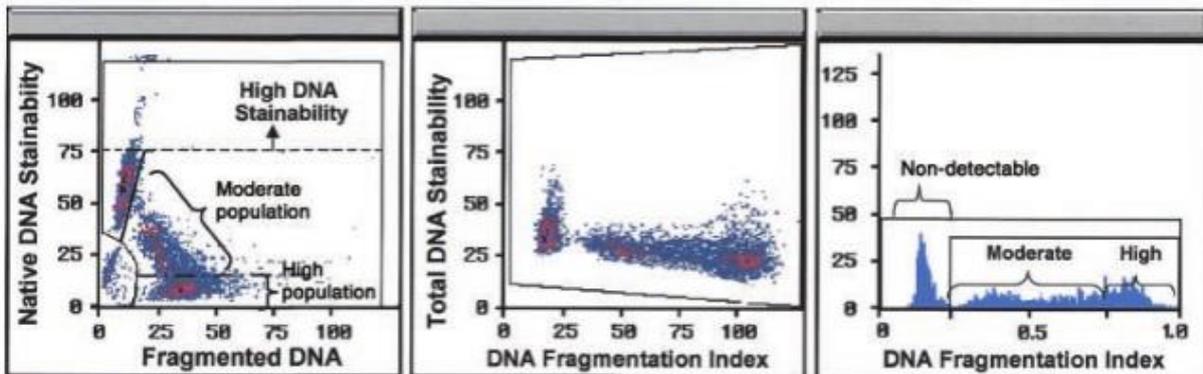


Figura 2: Ejemplo de gráficos obtenidos de resultados de SCSA. Estas gráficas corresponden a una muestra con mala condición de la cromatina (Evenson *et al.*, 2002).

2. OBJETIVO

La centrifugación en coloide en una sola capa (SLC) con Porcicoll permite eliminar bacterias de las dosis seminales. El objetivo de este trabajo es probar si se pueden procesar grandes volúmenes de muestra en un coloide de baja densidad (al 20% o 30%) para lograr recuentos bacterianos bajos, lo que permite el almacenamiento sin antibióticos, mientras se mantiene la calidad de los espermatozoides.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

En este estudio se analizó semen refrigerado de 10 verracos en dos tandas, cada una de ellas con muestras de 5 verracos. El eyaculado de cada cerdo se separó en tres partes: una parte se dejó sin centrifugar como control (CTL), otra parte se preparó mediante la centrifugación en coloide en una sola capa (SLC) con Porcicoll al 20% (P20), y la última parte se preparó mediante la SLC con Porcicoll al 30% (P30). Las muestras se almacenaron a 17 °C durante el experimento y se analizaron en los días 0, 3 y 7. Cada uno de estos días de análisis se tomó una alícuota de cada muestra y se analizó rápidamente la motilidad. Estos mismos días de análisis, también se tomó una alícuota de cada una de las muestras para los análisis posteriores y se almacenaron congeladas. Finalmente, estas muestras congeladas se analizaron mediante el análisis de la fragmentación de la cromatina Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA).

3.2. Reactivos y medios utilizados

Como diluyente seminal se utilizó Beltsville Thawing Solution (BTS). Para su preparación se utilizó glucosa D anhidro (glucosa; 24.379.294, GPR Rectapur, VWR, Auckland, Nueva Zelanda), citrato trisódico dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$; 71402, Sigma Aldrich, San Luis, EE.UU.), carbonato de hidrógeno sódico (NaHCO_3 ; S5761, Sigma Aldrich, San Luis, EE. UU.), etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA Na_2 ; 03685 Honeywell Fluka, San Luis, EE. UU.) y cloruro de potasio (KCl; P5405, Sigma Aldrich, San Luis, EE. UU.). La solución final se preparó a 205,37 mM de glucosa, 20,4 mM de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 14,88 mM de NaHCO_3 , 3,36 mM de EDTA Na_2 y 10,06 mM de KCl. Para este experimento se prepararon 100 ml de BTS, para lo cual se disolvieron en 80 ml de agua mili-Q 3,7 g de glucosa, 0,6 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0,125 g de NaHCO_3 , 0,125 g de EDTA Na_2 y 0,075 g de KCl. Se ajustó el pH a 7,2 y se enrasó hasta el volumen final (100 ml). Por último, se filtró el diluyente (filtro de 0,2 μm de diámetro de poro) en una botella y se almacenó a 4 °C en la cámara fría.

El coloide utilizado fue Porcicoll, una modificación de una formulación de sílice recubierto de silano, específico para porcino. Este se obtuvo gracias a la colaboración de la Dra. Jane Morrell de la Universidad de Ciencias Agrícolas de Suecia (SLU). El coloide se preparó a una densidad de 1,039 g/ml para P30 y a 1,026 g/ml para P20.

Para realizar el análisis de la cromatina SCSA se diluyeron las muestras en solución Tris/NaCl/EDTA (TNE), un medio tamponado que se utiliza para diluir las muestras antes de congelarlas. Los reactivos utilizados para preparar este medio fueron Trizma HCl (Tris-HCl;

T3253, Sigma-aldrich, San Luis, EE. UU.), cloruro de sodio (NaCl; 27810.295, VWR Chemicals, Lovaina, Bélgica) y EDTA Na₂ (03685, Honeywell Fluka, San Luis, EE. UU.) a una concentración de tris-HCl (0,01 M), NaCl (0,15 M), EDTA Na₂ (1 mM). En cuanto al TNE, se preparó primero una solución stock de 100 ml de TNE 10X. Para ello se diluyeron todos estos reactivos en 80 ml de agua mili-Q y después se enrasó hasta el volumen final (100 ml). A partir de la solución stock se preparó la solución de trabajo: TNE 1X, diluyendo la solución stock 1/10 en agua destilada. Se comprobó que el pH fuera 7,4 y se almacenó a 4 °C en la cámara fría.

Los reactivos que se usaron para evaluar la fragmentación de la cromatina mediante SCSA fueron una solución de detergente ácido, que destruye las membranas gracias al detergente y que desnaturaliza el DNA donde la cromatina es más laxa gracias al pH bajo, y una solución de naranja de acridina (AO), para teñir el ADN. La solución de detergente ácido contiene NaCl (27810.295, VWR Chemicals, Lovaina, Bélgica) a 0,15 M, ácido clorhídrico (HCl, H9892, Sigma Aldrich, San Luis, EE.UU.) a 0,08 N y Tritón (Tritón -X 100, T9284, Sigma Aldrich, San Luis, EE.UU.) a 0,1 %. Se ajustó el pH a 1,2. La solución de AO contiene fosfato disódico (Na₂HPO₄; 102495D, VWR Chemicals, Lovaina, Bélgica) a 0,2 M, EDTA Na₂ (03685, Honeywell Fluka, San Luis, EE. UU.) a 1 mM, NaCl (27810.295, VWR Chemicals, Lovaina, Bélgica) a 0,15 M, ácido cítrico (C₆H₈O; 7029K15331, Sigma Aldrich, San Luis, EE.UU.) a 0,1 M y naranja de acridina de alta pureza (24603, Polysciences, Philadelphia, EE.UU.) diluida en agua bidestilada filtrada a 6 µg/ml. En este caso se ajustó el pH a 6. La solución de AO debe ir cubierta por papel de aluminio para que la luz no incida sobre ella y no pierda la fluorescencia.

3.3. Preparación de las muestras

3.3.1. Obtención de las muestras espermáticas

En este estudio se obtuvo semen refrigerado procedente de diez verracos en dos días consecutivos (cinco muestras por día). Estas muestras fueron proporcionadas por el Centro Tecnológico de la Inseminación Artificial Topigs-Norsvin España, desde su centro ubicado en León, Campo de Villavidel. La recolección de las muestras se realizó de forma rutinaria en el centro sin mantener las condiciones de asepsia. Allí también se procesaron todos los eyaculados, añadiéndoles el diluyente seminal BTS para obtener una concentración final de 100×10⁶ espermatozoides/ml y obteniendo, al menos, 450 ml de semen diluido por macho. Tras ello, las muestras se enviaron y mantuvieron a 17 °C durante el transporte al laboratorio del Instituto de Sanidad Animal y Desarrollo Ganadero (INDEGSAL) de la Universidad de León.

2.3.2 Preparación de las dosis seminales en el laboratorio

Tras la recepción de las muestras en el laboratorio, a partir del eyaculado original de cada macho se trabajó en una campana de flujo laminar. Cada día se agruparon los dos eyaculados que tenían peor calidad y menor volumen del necesario, por lo que finalmente se obtuvieron 8 muestras (4 muestras por día). Después, pasamos un total de 12 ml a un tubo de 15 ml de cada macho. Este tubo constituyó el control de cada macho y el resto de muestra se utilizó para hacer las centrifugaciones con Porcicoll.

Las muestras que iban a ser sometidas a las centrifugaciones se transportaron al laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales para que la profesora Jane Morrell realizase la SLC, la cual se explica en el siguiente apartado.

2.3.3 Realización de SLC de las muestras

Este procedimiento fue realizado por la profesora Jane Morrell. Primero, se prepararon el Porcicoll a 20% y 30% en la campana de flujo laminar. Posteriormente, para cada muestra se depositaron 200 µl de semen diluido sobre 150 µl de Porcicoll (se hizo con el Porcicoll al 20% y al 30% por separado) en tubos de 500 µl. Se centrifugaron las muestras a 300xg durante 20 minutos.

A continuación, se retiró el sobrenadante en la campana de flujo laminar y seguidamente se transfirieron 1,5 ml de los pellets a tubos de 15 ml en los que previamente se habían añadido 13,5 ml de BTS para almacenarlos a 17 °C en la estufa del INDEGSAL, como se había hecho previamente con los controles.

Se obtuvieron, por tanto, 3 tubos de 15 ml para cada macho (CTL, P20 y P30), los cuales se mantuvieron en la estufa a 17 °C durante los 7 días que duró el experimento. Los análisis se realizaron en los días 0, 3 y 7, y en cada uno de estos días se tomó 1 ml de cada una de las muestras en un tubo de 1,5 ml en la campana de flujo laminar para analizarlo y así evitar manipular los tubos principales. Seguidamente, los tubos de 15 ml se devolvían a la estufa a 17 °C. Los tubos de 1,5 ml se colocaron a 22 °C y de estos tomamos por un lado una muestra para mirar la movilidad y, por otro lado, 300 µl de muestra para diluirlos en tubos de 1,5 ml en los que previamente se había alicuotado 1 ml de TNE para realizar el análisis de SCSA.

3.4. Análisis espermático

3.4.1. Evaluación de la motilidad espermática

Para analizar la motilidad espermática se utilizó un sistema computarizado de análisis seminal (CASA, Computer Assisted Sperm Analysis). Para ello, se utilizó el hemocitómetro de Makler.

Primero, diluimos las muestras a 1/5 - 1/10 en BTS para obtener una concentración de $10\text{-}30 \times 10^6$ espermatozoides/ml, ya que se partía de una concentración estimada de 100×10^6 espermatozoides/ml. Las muestras se mantuvieron a 37 °C mientras se observaban al microscopio gracias a una platina calefactada que el microscopio tiene. Depositamos 5 μl de muestra en una cámara de conteo Makler (Haifa Instruments, Israel), siempre procurando que esta estuviese sobre la platina calefactada. Para evaluar la muestra se utilizó un microscopio de contraste de fases (Nikon E400) y óptica de contraste negativo 10x provisto de una cámara Basler A312f (Basler AG, Ahrensburg, Alemania).

Tras ello, se adquirieron imágenes de al menos tres campos separados a 53 fotogramas/s y se analizaron los siguientes parámetros cinemáticos con el software ISAS 1.0.18 (Proiser SL, Valencia, España):

- Motilidad o movilidad espermática (MOT): proporción de espermatozoides con $VCL > 10 \mu\text{m/s}$.
- Motilidad progresiva (PROG): representa la proporción de espermatozoides con desplazamiento progresivo, definido como $VCL > 10 \mu\text{m/s}$ y $STR > 80\%$.
- Velocidad curvilínea (VCL): velocidad respecto a la trayectoria real, expresada en $\mu\text{m/s}$.
- Velocidad rectilínea (VSL): velocidad respecto a la trayectoria recta o lineal, expresada en $\mu\text{m/s}$.
- Velocidad media (VAP): velocidad respecto a la trayectoria “media” o suavizada, expresada en $\mu\text{m/s}$.
- Índice de linealidad (LIN): relación entre VSL y VCL, expresada como porcentaje. Indica la similitud de la trayectoria con una línea recta.
- Índice de rectitud (STR): relación entre VSL y VAP, expresada como porcentaje. Indica la similitud de la trayectoria suavizada con una línea recta.
- Índice de oscilación (WOB): relación entre VAP y VCL expresada como porcentaje. Ofrece una estimación de la sinuosidad de la trayectoria real.
- Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH): valor medio del desplazamiento que realiza la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea a un lado y otro de la trayectoria lineal, expresado en μm .
- Frecuencia de batido (BCF): relación entre el número de veces que la trayectoria real cruza la trayectoria suavizada y el tiempo total. Indica la intensidad del batido flagelar expresado en Hz.

- Baile o dance (DNC): medida del patrón de movimiento de los espermatozoides, mediante la media de la trayectoria individual de los espermatozoides. Representa ALH multiplicado por VCL ($\mu\text{m}^2/\text{s}$).
- Media de baile o dance mean (DNCm): medida del patrón de movimiento de los espermatozoides, que representa la relación entre ALH y LIN (μm).

3.4.2. Evaluación de la cromatina espermática mediante SCSA

Para analizar el estado de la cromatina se utilizó la técnica SCSA. (Sperm Chromatin Structure Assay). Para ello, en primer lugar, se diluyeron las muestras en la solución de TNE para que se conservasen mejor a -80°C . Teniendo en cuenta que tomamos $300\ \mu\text{l}$ de la muestra (a 100×10^6 espermatozoides/ml) y que se diluyeron en 1 ml de TNE, se sabe que las muestras congeladas se encontraban a una concentración de 30×10^6 espermatozoides / ml.

En primer lugar, se procedió a descongelar las muestras y unas muestras estándar de cerdo en un baño de agua (a 37°C durante 30 segundos). Estas muestras estándar son muestras que han mostrado una baja fragmentación y que sirven como control para ajustar los láseres del citómetro. De cada uno de las muestras se tomaron $10\ \mu\text{l}$ que se pasaron a tubos de citometría en los que se había añadido previamente $90\ \mu\text{l}$ de TNE, y se encontraban en hielo (del mismo modo que la solución detergente ácida y la solución AO). De este modo se hizo una dilución 1/10 de estas muestras obteniendo una concentración final de 3×10^6 espermatozoides/ml, que es una concentración a la que las células pasan a una velocidad adecuada por el citómetro para poder leerlas.

A continuación, se procedió a preparar el citómetro. El citómetro utilizado fue el BD FACSCalibur™ Flow cytometer conectado al ordenador con el software BD CellQuest™. Este citómetro contiene dos láseres, uno de argón refrigerado por aire que emite en azul ($488\ \text{nm}$) y un láser de diodo que emite en rojo ($\sim 635\ \text{nm}$). A su vez, el citómetro se compone de varios fotodetectores y filtros para recoger la luz dispersada por la muestra. Entre estos se encuentra el Forward Scatter (FSC-H), que recoge la luz dispersada frontalmente y es proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión (lleva un filtro de $488/10\ \text{nm}$ que recoge luz azul), el Side Scatter (SSC-H), que recoge luz dispersada lateralmente y es proporcional a la complejidad de la estructura (lleva un filtro de $488/10\ \text{nm}$ que recoge luz azul) y los fotodetectores FL1, FL2, FL3 y FL4 con sus correspondientes filtros. El naranja de acridina emite en rojo y verde, por tanto, los fotodetectores que lo captan son el FL3, en el caso de la fluorescencia roja, y FL1, en el caso de la fluorescencia verde (Evenson y Jost, 2000). La

información que estos fotodetectores captan pasa por unos fotomultiplicadores y se convierte en una señal eléctrica que es interpretada por el software mencionado. La sala donde se encuentra el citómetro debe estar a oscuras para que la luz no incida directamente sobre la solución de AO.

Se encendió el citómetro siguiendo todos los pasos necesarios para su uso correcto. Se puso la plantilla y la configuración apropiadas en el programa (porcino) y se puso a correr agua 15 minutos a una velocidad rápida para limpiar el sistema antes de empezar.

Antes de empezar a procesar las muestras se preparó y pasó por el citómetro una solución blanco constituida por 400 µl de solución detergente ácida y 1,2 ml de AO, para estabilizar el flujo y arrastrar células del tubo anterior. Esta solución blanco también se pasó entre cada muestra para que no se arrastrasen células de una muestra a la siguiente.

Seguidamente, se empezaron a pasar las muestras. Primero se pasaron 2 estándares para ajustar los parámetros del citómetro (para que el láser X = FL3 tenga un valor de 130, y el láser Y = FL1 de 500) y para excluir debris e incluir todas las células de interés. Los estándares se prepararon igual que las muestras posteriores. Se tomaron 100 µl de muestra o estándar en cada caso, se le añadieron 200 µl de solución detergente ácida y tras contar 30 segundos se le añadieron 600 µl de solución de AO. Después de 2 minutos y medio se pasó la muestra por el citómetro. Para el resto de muestras analizadas no se ajustaron los láseres, sólo se leyeron las muestras a los 3 minutos.

La velocidad de flujo del citómetro debía estar entre 200-250 células/s, y cuando el citómetro alcanzaba los 5000 eventos paraba automáticamente, proporcionando los valores de interés y generando un archivo para cada muestra en formato FCS, que después fue leído por el software de análisis. Finalmente, se apagó el citómetro siguiendo el protocolo de limpieza.

3.5. Análisis estadístico

Los datos del análisis de la movilidad se procesaron y analizaron con el paquete estadístico R (versión 3.1.0, The R Foundation for Statistical Computing <https://www.r-project.org/>). Se utilizaron modelos lineales de efectos mixtos para determinar el efecto del tratamiento sobre los parámetros analizados en cada día de trabajo. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar.

En el caso de los datos de SCSA se utilizó el paquete flowCore para leer y trabajar con archivos FCS y obtener las variables %DFI y %HDS. %DFI es una medida de la fragmentación del ADN

espermático. Primero se obtiene de la relación fluorescencia roja / fluorescencia total, y el %DFI es la proporción de células con este índice por encima de 250 (tras multiplicarlo por 1000). El %HDS es una estimación de la compactación del núcleo espermático, y se obtiene de la proporción de células con fluorescencia verde por encima del canal 650.

4. RESULTADOS

4.1. Movilidad espermática

A continuación, se muestran los resultados del análisis de la movilidad espermática. Se obtuvieron los datos para los parámetros explicados en el apartado 3.4.1., los cuales se explicarán seguidamente. En la Tabla 2 se muestran las variaciones en la movilidad espermática entre la muestra control y las muestras P20 y P30 sin tener en cuenta el día de muestreo. Las Tablas 4, 5 y 6 que se encuentran en el anexo detallan las variaciones en la movilidad espermática entre la muestra control y las muestras P20 y P30 segmentadas por días. La Tabla 4 muestra las variaciones en la movilidad espermática en el día 0, la Tabla 5 muestra las variaciones en el día 3 y la tabla 6 muestra las variaciones en el día 7. En las gráficas de líneas de las Figuras 3 y 4 se pueden observar las variaciones en los distintos parámetros de la movilidad entre los tratamientos y los días.

Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para la mayoría de los parámetros. Las motilidades total y progresiva (MOT y PROG) fueron ligeramente mayores para las muestras P20 y P30 en comparación con los controles atendiendo a los datos sin segmentar por días. Sin embargo, observando los datos segmentados por días se pueden apreciar diferencias significativas entre los tratamientos. Concretamente, el día 0 del experimento las muestras P20 y P30 mostraron un significativo menor porcentaje de movilidad respecto a las muestras control ($P < 0,001$ y $P = 0,023$). No obstante, en los días posteriores esto cambió y el último día del experimento las muestras P30 mostraron resultados significativamente mayores que los controles ($P = 0,047$). En el caso del porcentaje de movilidad progresiva sucedió algo similar, el día 0 los resultados de las muestras centrifugadas fueron menores comparados con los de los controles, pero en los siguientes días dichas muestras presentaron resultados más elevados que las muestras control.

Mientras que la velocidad rectilínea (VSL) apenas varió entre los tratamientos, las velocidades curvilínea (VCL) y media (VAP) aumentaron ligeramente para las muestras P20 y P30 en comparación con los controles. No obstante, los datos segmentados por días sí que muestran diferencias significativas. En el caso de VCL, se observaron significativamente mayores resultados en la muestra P20 respecto al control ($P = 0,032$) en el día 0. Las diferencias en los resultados entre las muestras centrifugadas y las muestras control se redujeron, obteniendo resultados muy similares el último día del experimento para este parámetro. Los factores VSL y VAP, en cambio, mostraron resultados muy similares para los diferentes tratamientos el primer día del experimento, tras lo que los resultados para las muestras SLC aumentaron

(especialmente en el caso de las muestras P20). Finalmente, los resultados de VAP de las muestras SLC se redujeron hasta llegar al nivel de los controles, mientras que los resultados de VSL de las muestras SLC se mantuvieron siempre por encima de los controles.

En cuanto a los índices de linealidad y de rectitud (LIN, STR), estos fueron ligeramente menores en las muestras P20 y P30. De hecho, las muestras P30 mostraron resultados significativamente menores en LIN en el primer día del experimento respecto a las muestras control ($P = 0,042$). A pesar de ello, los resultados para estos parámetros cambiaron según avanzó el experimento y el último día se observaron valores superiores en las muestras SLC a los de las muestras control.

En el índice de oscilación (WOB) se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, concretamente, hubo datos significativamente menores en las muestras P20 que en controles ($P = 0,013$). De la misma manera, en los datos segmentados por días observamos resultados significativamente menores para las muestras P20 y P30 en el día 0 ($P = 0,021$ y $P = 0,016$ respecto al control, respectivamente).

Los parámetros ALH y BCF mostraron resultados muy ligeramente mayores en las muestras tratadas frente a las control. El factor ALH mostró resultados significativamente mayores en las muestras P20 ($P = 0,015$ vs control) en el día 0. Pese a ello, los resultados de ALH de las muestras control y las centrifugadas se igualaron el último día del experimento. El factor BCF, en cambio, se mantuvo superior en las muestras SLC durante todo el experimento.

Tanto DNC como DNCm mostraron resultados ligeramente mayores para las muestras P20 y P30 respecto a los controles. En la misma línea, los datos segmentados por días muestran unos significativamente mayores resultados para los parámetros DNC y DNCm en las muestras P20 ($P = 0,02$ y $P = 0,018$ vs control, respectivamente). Sin embargo, el último día del experimento esto cambia, obteniendo mayores resultados para las muestras control.

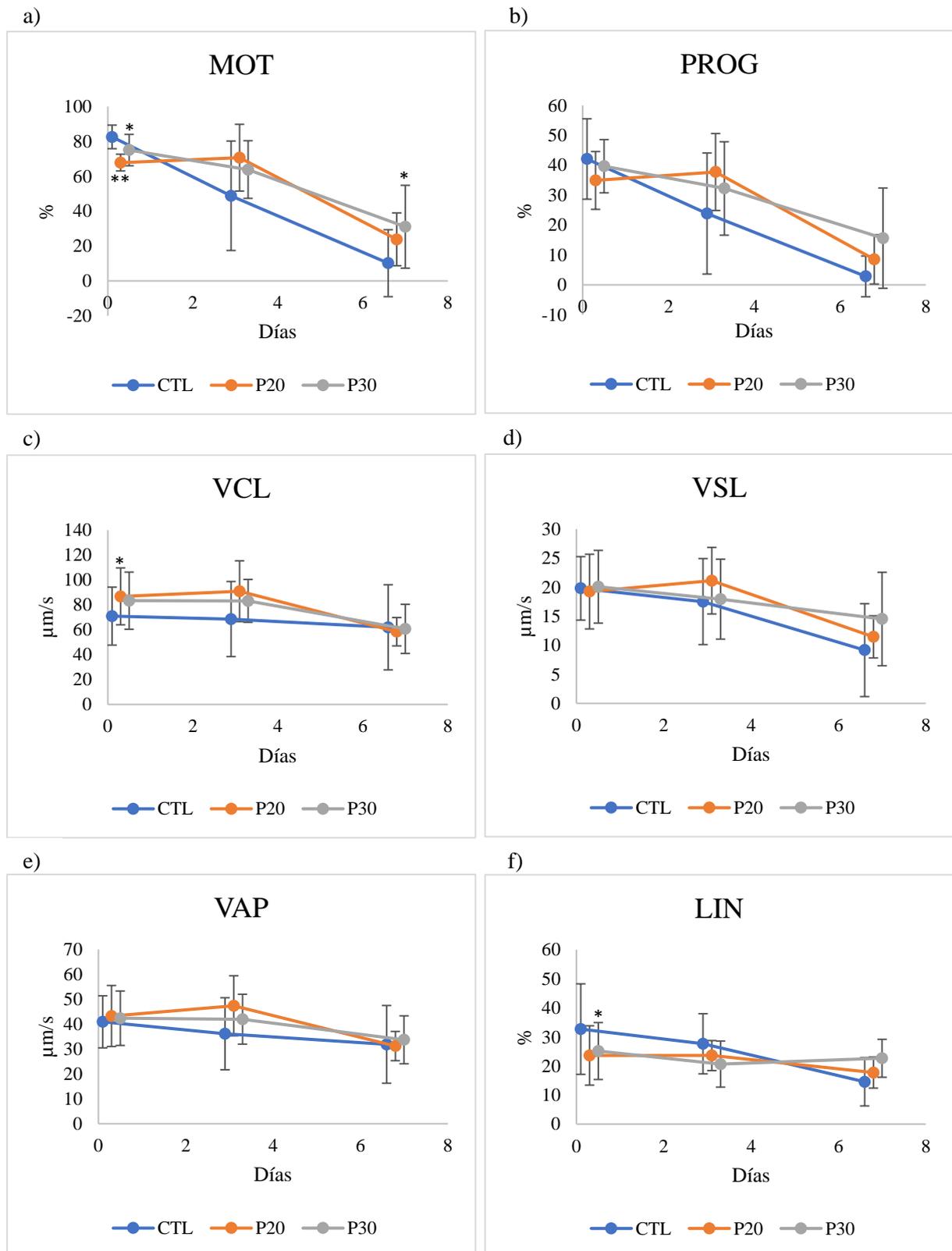


Figura 3: Efectos del tiempo sobre los diferentes parámetros de la movilidad de los espermatozoides de cerdo CTL, P20 y P30. Se muestran los resultados para la movilidad total (subfigura a), la movilidad progresiva (subfigura b), la velocidad curvilínea (subfigura c), la velocidad rectilínea (subfigura d), la velocidad media (subfigura e) y el índice de linealidad (subfigura e). En cada gráfico se indican la media en cada caso y las desviaciones típicas. Control vs. centrifugados: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

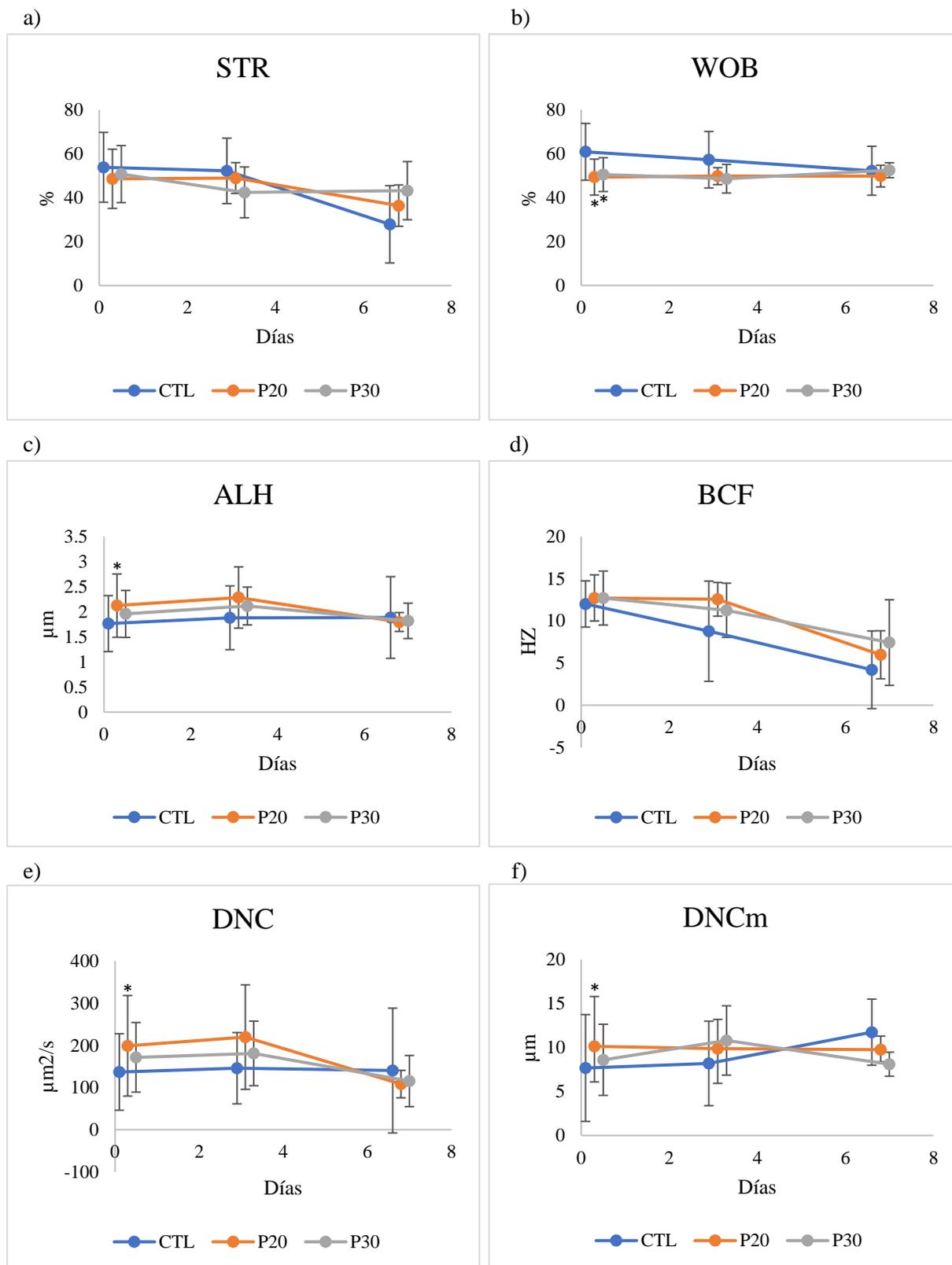


Figura 4: Efectos del tiempo sobre los diferentes parámetros de la movilidad de los espermatozoides de cerdo CTL, P20 y P30. Se muestran los resultados para el índice de rectitud (subfigura a), el índice de oscilación (subfigura b), la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (subfigura c), la frecuencia de batido (subfigura d) y los parámetros referentes al patrón de movimiento (subfiguras e y f). En cada gráfico se indican la media en cada caso y las desviaciones típicas. Control vs. centrifugados: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

Tabla 2: Movilidad y parámetros cinéticos de los espermatozoides de cerdo control (CTL), sometidos a SCL con Porcicoll al 20% (P20) y sometidos a SCL con Porcicoll al 30% (P30). Se muestra la media \pm la desviación típica (SD) de los datos agrupados sin tener en cuenta el día de muestreo. Control vs. centrifugados: *P \leq 0,05; **P \leq 0,01.

Parámetro	CTL	P20	P30
MOT (%)	47,19 \pm 36,59	54,12 \pm 25,84	56,65 \pm 25,35
PROG (%)	22,93 \pm 21,50	27,06 \pm 16,74	29,19 \pm 17,06
VCL ($\mu\text{m/s}$)	67,88 \pm 27,48	78,67 \pm 24,44	75,73 \pm 22,08
VSL ($\mu\text{m/s}$)	16,39 \pm 7,78	17,27 \pm 6,69	17,51 \pm 7,17
VAP ($\mu\text{m/s}$)	36,95 \pm 13,16	40,61 \pm 12,23	39,36 \pm 10,57
LIN (%)	26,45 \pm 13,70	21,65 \pm 7,52	22,81 \pm 8,05
STR (%)	47,02 \pm 18,68	44,63 \pm 11,52	45,45 \pm 12,66
WOB (%)	57,40 \pm 12,36	49,61 \pm 5,69*	50,49 \pm 6,09
ALH (μm)	1,84 \pm 0,62	2,07 \pm 0,54	1,96 \pm 0,4
BCF (HZ)	8,91 \pm 5,35	10,41 \pm 4,03	10,46 \pm 4,39
DNC ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	140,98 \pm 98,80	175,51 \pm 108,41	155,86 \pm 76,48
DNCm (μm)	8,84 \pm 5,16	9,92 \pm 3,73	9,17 \pm 3,42

4.2. Cromatina espermática

A continuación, se muestran los resultados del análisis de la cromatina espermática mediante la técnica SCSA. Se obtuvieron los datos para los parámetros explicados en el apartado 1.5.2., pero solo algunos de ellos han sido usados en este estudio para explicar los resultados. En la Tabla 3 se muestran las variaciones en los parámetros de la fragmentación entre la muestra control y las muestras P20 y P30 sin tener en cuenta el día de muestreo. En este caso se analizaron únicamente las variables %DFI y %HDS, dado que son las de mayor relevancia para el análisis. Las Tablas 7, 8 y 9 que se encuentran en el anexo detallan las variaciones en la fragmentación de la cromatina espermática entre la muestra control y las muestras P20 y P30 segmentadas por días. La Tabla 7 muestra las variaciones en la fragmentación de la cromatina en el día 0, la Tabla 8 muestra las variaciones en el día 3 y la tabla 9 muestra las variaciones en el día 7. En las gráficas de líneas de la Figura 5 se pueden observar las variaciones en los distintos parámetros de la fragmentación de la cromatina entre los tratamientos y los días.

Respecto a %DFI, se pueden observar resultados ligeramente mayores en las muestras P30 respecto a las control y resultados ligeramente menores en las muestras P20. Atendiendo a los datos segmentados por días, se observaron resultados ligeramente menores en las muestras SLC

comparadas con las muestras control. Sin embargo, esto fue cambiando a lo largo del experimento y finalmente las muestras SLC mostraron resultados mayores a los controles.

Por otro lado, el %HDS mostró resultados significativamente menores en las muestras P20 y P30 ($P < 0,001$ y $P = 0,01$ respecto a los controles, respectivamente). Observando los datos segmentados por días, se aprecian datos significativamente menores en las muestras SLC en comparación con los controles ($P = 0,005$ para P20 y $P = 0,009$ para P30). El %HDS de las muestras control en el día 3 sufrió una reducción importante, manteniéndose aun así por encima del %HDS de las muestras SLC. El %HDS de las muestras P20 también se redujo ligeramente este día. No obstante, el último día del experimento apenas se apreciaron variaciones en el %HDS.

Tabla 3: Parámetros de la fragmentación de la cromatina de los espermatozoides de cerdo control (CTL), sometidos a SCL con Porcicoll al 20% (P20) y sometidos a SCL con Porcicoll al 30% (P30). Se muestra la media \pm la desviación típica (SD) de los datos agrupados sin tener en cuenta el día de muestreo. Control vs. centrifugados: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

PARÁMETRO	CTL	P20	P30
%DFI (%)	1,69 \pm 1,59	1,52 \pm 1,89	2,05 \pm 2,87
HDS (%)	3,88 \pm 2,08	2,77 \pm 1,82**	2,9 \pm 2,24*

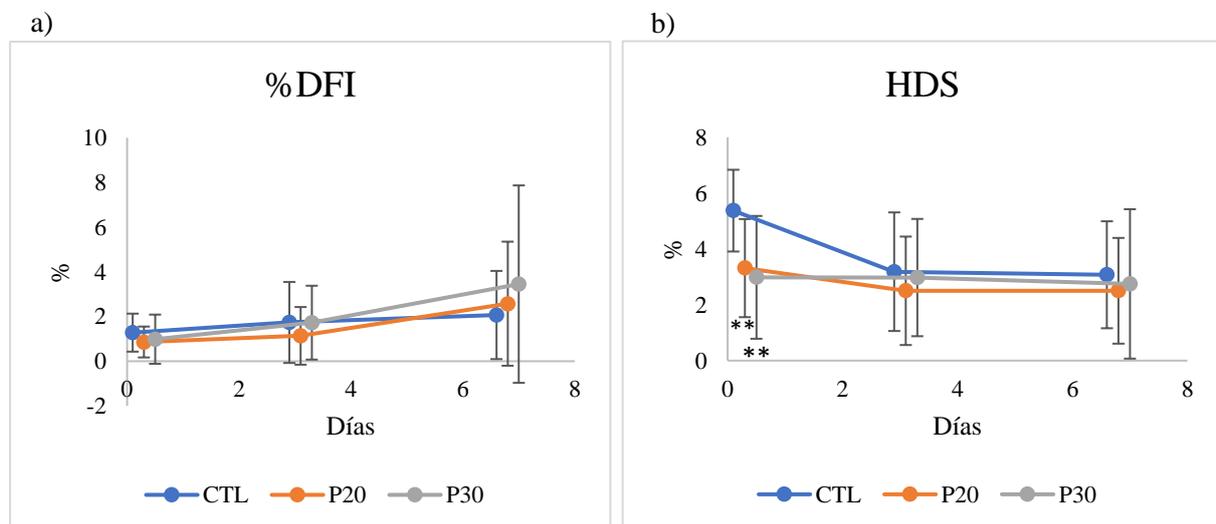


Figura 5: Efectos del tiempo sobre los diferentes parámetros de la fragmentación de la cromatina espermática CTL, P20 y P30. Se muestran los resultados para el porcentaje de DFI total (subfiguras a) y el % de espermatozoides con fluorescencia verde aumentada (subfigura b). En cada gráfico se indican la media en cada caso y las desviaciones típicas. Control vs. centrifugados: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

5. DISCUSIÓN

La mayoría de los eyaculados suelen contaminarse con bacterias durante la recolección y el procesamiento del semen, a pesar de ser recolectados de animales sanos (Althouse *et al.*, 2008). Además de afectar negativamente a la calidad del esperma, al competir por los nutrientes en el diluyente seminal o por la producción de subproductos metabólicos y endotoxinas, las bacterias pueden causar enfermedades uterinas en hembras inseminadas. Para controlar el crecimiento de bacterias, se suelen agregar antibióticos a los diluyentes seminales de acuerdo con las pautas nacionales e internacionales. Sin embargo, el uso de antibióticos en general puede conducir al desarrollo de resistencias microbianas, que puede transmitirse a otros animales y también entre humanos y animales. Por lo tanto, es de gran relevancia el desarrollo de alternativas a los antimicrobianos en los diluyentes seminales para poder eliminar las bacterias de los eyaculados (Morrell, 2016). Estudios anteriores han mostrado que es posible obtener muestras de espermatozoides libres de bacterias, o muestras de espermatozoides con una carga bacteriana reducida sin ningún efecto perjudicial aparente sobre la motilidad del esperma, utilizando la Centrifugación en coloide en una sola capa (SLC) con Porcicoll (Morrell y Wallgren, 2011).

El objetivo de este estudio fue procesar grandes volúmenes de muestras seminales mediante la SLC con Porcicoll en baja densidad (20 % y 30 %) para eliminar las bacterias de estas sin dañar los espermatozoides, puesto que el propósito de esta investigación es contribuir a la reducción del uso de antibióticos en los diluyentes seminales. Concretamente, en este trabajo nos hemos centrado en comprobar si dicha técnica permite mantener la calidad de los espermatozoides de cerdo, centrándonos en el análisis de la motilidad espermática y el análisis de la fragmentación de la cromatina. Los análisis se llevaron a cabo en los días 0, 3 y 7, debido a que las empresas de inseminación porcina, donde se producen las dosis seminales, tienen que enviar el semen a las granjas, donde se realiza la inseminación generalmente entre 3-5 días después de producir las dosis, a veces incluso hasta 7 días más tarde. Los resultados obtenidos muestran que sólo hubo pequeñas diferencias en la calidad de los espermatozoides entre las muestras centrifugadas y los controles.

Atendiendo a los parámetros de la movilidad, por lo general los resultados no muestran un deterioro de la calidad en las muestras SLC en comparación con los controles, exceptuando el parámetro WOB, el cual sí que sufrió una importante reducción en las muestras centrifugadas. En lo referente a los datos segmentados por días, los resultados muestran un menor porcentaje de movilidad total y progresiva en las muestras SLC respecto a las muestras control en el día 0. Esto se piensa que fue debido a la adhesión de los espermatozoides a la cámara Makler o entre

ellos, puesto que también ha ocurrido en experimentos anteriores (Morrell *et al.*, 2019), y tiende a solucionarse durante el almacenamiento. De forma similar a lo ocurrido en el experimento de Morrell *et al.* (2019), en este caso las movilidades total y progresiva también mostraron una recuperación en los días 3 y 7 en las muestras SLC. Lo cual podría indicar que la técnica favorece la preservación de la calidad de las muestras seminales en el tiempo.

Los parámetros VSL, VAP y BCF mostraron valores más elevados en las muestras SLC que en los controles durante todo el experimento. Otras como MOT, PROG y LIN, en cambio, tuvieron menores resultados en el día 0 en las muestras SLC, pero durante el almacenamiento el patrón se invirtió, obteniendo mayores resultados en los siguientes días del experimento en las muestras SLC. También hubo algunos parámetros en los que a pesar de obtener mayores resultados en las muestras SLC el día 0 del experimento, al final de este los controles mostraron mayores resultados, como es el caso de VCL, ALH, DNC y DNCm. De cualquier modo, estas diferencias no son lo suficientemente grandes como para considerar que la calidad de los espermatozoides se haya visto afectada por la SLC con Porcicoll.

Estos resultados coinciden con los que obtuvieron Morrell *et al.* (2019) cuando utilizaron Porcicoll al 40 %, puesto que tampoco se mostró un efecto notable en la calidad seminal de las muestras SLC comparadas con los controles. No obstante, en otro estudio en el que se ha utilizado el mismo coloide en mayor densidad (Martinez-Alborcia *et al.*, 2013) con el propósito de mejorar la supervivencia de los espermatozoides criopreservados, se observó una mayor movilidad en las muestras SLC. Análogamente, en el estudio realizado por Martinez-Alborcia *et al.* (2012) en el que se centrifugaron las muestras seminales antes de criopreservarlas, los resultados mostraron una mayor movilidad en las muestras centrifugadas en comparación con los controles. Algo semejante ocurre en el estudio de (Morrell *et al.*, 2010), en el que los resultados muestran una mayor movilidad en las muestras SLC de semen de caballo en comparación con los controles. Esto puede parecer que se opone a los resultados obtenidos en el presente trabajo, pero estas diferencias se deben a que en nuestro caso se utilizó un coloide en bajas densidades, que, por ende, no selecciona los espermatozoides de mejor calidad. Los resultados obtenidos por Morrell *et al.* (2011) apoyan esta afirmación. En el estudio que llevaron a cabo con semen de caballo los resultados mostraron que un aumento de la densidad del coloide utilizado permite reducir las pérdidas de espermatozoides durante la centrifugación coloidal para obtener espermatozoides de mayor calidad.

En lo referido a los parámetros de la fragmentación de la cromatina espermática, cabe destacar la significativa reducción del %HDS en las muestras SLC respecto a los controles. Este parámetro indica el porcentaje de células con fluorescencia verde aumentada, que es indicativo de la descondensación de la cromatina o la inmadurez espermática. Por consiguiente, se puede deducir a partir de los resultados que la SLC con Porcicoll no afectó negativamente a la descondensación de la cromatina de las muestras, es más, incluso la mejoró en todos los casos. Sin embargo, en el caso del %DFI (fragmentación del ADN espermático), a pesar de que el día 0 las muestras SLC mostraron un menor porcentaje de fragmentación que los controles, según avanzó el experimento esto cambió y el %DFI aumento ligeramente en las muestras SLC, especialmente en las P30.

El SCSA es una potente herramienta de diagnóstico para determinar la proporción de daño en el ADN en los espermatozoides de muchas especies (Cordelli *et al.*, 2005). En el estudio realizado por Goodla *et al.* (2014) con semen de toro se observó menos daño en el ADN en los espermatozoides seleccionados por SLC que en las muestras no seleccionadas, lo cual concluyeron que podía deberse a que la SLC selecciona espermatozoides maduros con cromatina intacta, eliminando los espermatozoides inmaduros y dañados y el plasma seminal. En otros experimentos con caballos, como es el caso del trabajo realizado por Macías García *et al.* (2009), la centrifugación coloidal en una sola capa también disminuyó el %DFI en un 50% en espermatozoides criopreservados. De modo idéntico, los resultados de Morrell *et al.* (2011) y de Morrell *et al.* (2010) mostraron una reducción en el %DFI tras la SLC de semen de caballo. Como se ha mencionado anteriormente, esto se debe al uso de un coloide de mayor densidad que el utilizado en el presente estudio. Esta afirmación es consistente con los resultados que obtuvieron Deori *et al.* en un experimento preliminar similar al presente trabajo. En este experimento también se utilizó el mismo coloide en baja densidad y los resultados no mostraron diferencias en el %DFI entre los controles y las muestras centrifugadas. Adicionalmente, las diferencias en el %DFI que se observaron en el presente estudio resultan insignificantes y se puede concluir que la integridad de la cromatina se mantiene tras la SLC con Porcicoll al 20% y 30%.

Los resultados han mostrado que la SLC con Porcicoll en ambas densidades no tuvo importantes efectos adversos sobre la calidad de los espermatozoides, concretamente sobre la movilidad espermática y la integridad de la cromatina espermática. Además, aunque no consta en este trabajo, se realizó el análisis de la carga bacteriana y se observó que la SLC fue eficaz reduciendo o eliminando varias especies bacterianas de la muestra espermática.

6. CONCLUSIONES

- 1) El uso de la centrifugación en coloide en una sola capa (SLC) con Porcicoll de baja densidad (ya sea al 20% o al 30%) permite eliminar la mayor parte de las bacterias de las muestras de semen de cerdo.
- 2) La versión escalada en tubos de 500 ml posibilita el procesamiento de muestras seminales de cerdo de gran volumen de forma sencilla.
- 3) La calidad de los espermatozoides en las muestras a las que se realizó la SLC con Porcicoll al 20% y al 30% no se deterioró en comparación con las muestras control.
- 4) Las muestras procesadas mediante SLC con Porcicoll al 20% y al 30% mantuvieron mejor la calidad tras el almacenamiento durante 7 días que las muestras control.
- 5) No hubo diferencias entre las muestras centrifugadas con Porcicoll al 20% y al 30%.

7. REFERENCIAS

- Althouse, G. C., Pierdon, M. S. y Lu, K. G. (2008) "Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen.", *Theriogenology*, 70(8), pp. 1317–1323.
- Boe-Hansen, G. B., Christensen, P., Vibjerg, D., Nielsen, M. B. F. y Hedeboe, A. M. (2008) "Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility", *Theriogenology*, 69(6), pp. 728–736.
- Bompart, D., García-Molina, A., Valverde, A., Caldeira, C., Yániz, J., Núñez de Murga, M. y Soler, C. (2018) "CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber", *Reproduction, fertility and development*, 30(6), pp. 810–819.
- Cordelli, E., Eleuteri, P., Leter, G., Rescia, M. y Spanò, M. (2005) "Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity", *Contraception*, 72(4), pp. 273–279.
- Crespo-Félez, I., Castañeda-Sampedro, A., Sánchez, D. I., Fernández-Alegre, E., Álvarez-Rodríguez, M., Domínguez, J. C., Morrell, J. M. y Martínez-Pastor, F. (2017) "Effect of Single Layer Centrifugation Porcicoll (70%, 80% and 90%) or supplementation with reduced glutathione, seminal plasma and bovine serum albumin on frozen-thawed boar sperm.", *Animal reproduction science*, 187, pp. 167–173.
- Didion, B. A., Kasperson, K. M., Wixon, R. L. y Evenson, D. P. (2009) "Boar fertility and sperm chromatin structure status: A retrospective report", *Journal of andrology*, 30(6), pp. 655–660.
- Evenson, D. (2011) "Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®)", en Zini, A. y Agarwal, A. (eds.) *Sperm chromatin: Biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction*. 1.^a ed. Springer Science and Business Media LLC, pp. 487–493.
- Evenson, D. y Jost, L. (2000) "Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment.", *Methods in cell science: an official journal of the Society for In Vitro Biology*, 22(2–3), pp. 169–189.
- Evenson, D. P., Larson, K. L. y Jost, L. K. (2002) "Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques.", *Journal of andrology*, 23(1), pp. 25–43.
- Goodla, L., Morrell, J. M., Yusnizar, Y., Stålhammar, H. y Johannisson, A. (2014) "Quality of bull spermatozoa after preparation by single-layer centrifugation", *Journal of dairy science*, 97(4), pp. 2204–2212.
- Hosseinfar, H., Yazdanikhah, S., Modarresi, T., Totonchi, M., Sadighi Gilani, M. A. y Sabbaghian, M. (2015) "Correlation between sperm DNA fragmentation index and CMA3 positive spermatozoa in globozoospermic patients.", *Andrology*, 3(3), pp. 526–531.
- Khezri, A., Narud, B., Stenseth, E.-B., Johannisson, A., Myromslien, F. D., Gaustad, A. H., Wilson, R. C., Lyle, R., Morrell, J. M., Kommisrud, E. y Ahmad, R. (2019) "DNA methylation patterns vary in boar sperm cells with different levels of DNA fragmentation", *BMC Genomics*, 20(1), p. 897.
- Knox, R. V (2016) "Artificial insemination in pigs today.", *Theriogenology*, 85(1), pp. 83–93.
- Macías García, B., Morrell, J. M., Ortega-Ferrusola, C., González-Fernández, L., Tapia, J. A., Rodríguez-Martínez, H. y Peña, F. J. (2009) "Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen", *Animal reproduction science*, 114(1), pp. 193–202.
- Martínez-Alborcia, M. J., Morrell, J. M., Gil, M. A., Barranco, I., Maside, C., Alkmin, D. V, Parrilla, I., Martínez, E. A. y Roca, J. (2013) "Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa", *Animal reproduction science*, 140(3–4), pp. 173–179.
- Martínez-Alborcia, M. J., Morrell, J. M., Parrilla, I., Barranco, I., Vázquez, J. M., Martínez, E. A. y Roca, J. (2012) "Improvement of boar sperm cryosurvival by using single-layer colloid centrifugation prior freezing", *Theriogenology*, 78(5), pp. 1117–1125.
- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L. y de Paz, P. (2010) "Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry", *Reproduction in domestic animals*, 45(SUPPL. 2), pp. 67–78.
- Ministerio de Agricultura, P. y A. (sin fecha) *Sector porcino en España*. Disponible en:

<https://www.mapa.gob.es/va/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/>
(Accedido: 8 de mayo de 2020).

- Morrell, J. (2016) "Colloids: Applications in sperm preparation for assisted reproduction", en Rahman, M. M. y Asiri, A. M. (eds.) *Advances in colloid science*. 1.^a ed. Rijeka: IntechOpen, pp. 189-208.
- Morrell, J. M. (2019) "Effect of colloid centrifugation on boar sperm quality during storage and function in in vitro fertilization", *Theriogenology*, 137, pp. 122–126.
- Morrell, J. M., Johannisson, A. y Rodriguez-Martinez, H. (2011) "Effect of osmolarity and density of colloid formulations on the outcome of SLC-selection of stallion spermatozoa", *ISRN veterinary science*. doi:10.5402/2011/128984.
- Morrell, J. M., Núñez-González, A., Crespo-Félez, I., Martínez-Martínez, S., Martínez Alborcia, M.-J., Fernández-Alegre, E., Dominguez, J. C., Gutiérrez-Martín, C. B. y Martínez-Pastor, F. (2019) "Removal of bacteria from boar semen using a low-density colloid.", *Theriogenology*, 126, pp. 272–278.
- Morrell, J. M., Rodriguez-Martinez, H. y Johannisson, A. (2010) "Single layer centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size", *Equine veterinary journal*, 42(7), pp. 579–585.
- Morrell, J. M., Saravia, F., van Wienen, M., Wallgren, M. y Rodriguez-Martinez, H. (2009) "Selection of boar spermatozoa using centrifugation on a glycidoxypolytrimethoxysilane-coated silica colloid", *The journal of reproduction and development*, 55(5), pp. 547–552.
- Morrell, J. M. y Wallgren, M. (2011) "Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders", *Animal reproduction science*, 123(1–2), pp. 64–69.
- Mortimer, S. T., van der Horst, G. y Mortimer, D. (2015) "The future of computer-aided sperm analysis", *Asian journal of andrology*, 17(4), pp. 545–553.
- Roca, J., Parrilla, I., Bolarin, A., Martinez, E. A. y Rodriguez-Martinez, H. (2016) "Will AI in pigs become more efficient?", *Theriogenology*, 86(1), pp. 187–193.
- Roca, J., Vázquez, J., Gil, M., Cuello, C., Parrilla, I. y Martínez, E. (2006) "Challenges in pig artificial insemination", *Reproduction in domestic animals*, 41(s2), pp. 43–53.
- Shimada, M., Yamashita, Y. y Okazaki, T. (2016) "Development of artificial insemination technique in pig production based on the evidence of physiology and molecular biology in reproductive organs", *AGri-bioscience monographs*, 6, pp. 59–83.
- Sjunnesson, Y. C. B., Morrell, J. M. y González, R. (2013) "Single layer centrifugation-selected boar spermatozoa are capable of fertilization in vitro", *Acta veterinaria scandinavica*, 55(1), p. 20.
- Soler, C., Picazo-Bueno, J. Á., Micó, V., Valverde, A., Bompard, D., Blasco, F. J., Álvarez, J. G. y García-Molina, A. (2018) "Effect of counting chamber depth on the accuracy of lensless microscopy for the assessment of boar sperm motility", *Reproduction, fertility, and development*, 30(6), pp. 924–934.
- Spencer, K. W., Purdy, P. H., Blackburn, H. D., Spiller, S. F., Stewart, T. S. y Knox, R. V (2010) "Effect of number of motile, frozen-thawed boar sperm and number of fixed-time inseminations on fertility in estrous-synchronized gilts", *Animal reproduction science*, 121(3–4), pp. 259–266.
- Waberski, D., Riesenbeck, A., Schulze, M., Weitze, K.-F. y Johnson, L. (2019) "Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges", *Theriogenology*, 137, pp. 2-7.