

Actualidades en Inseminación Artificial Porcina

José A. García Ruvalcaba, Pablo Conde
Departamento Técnico
KUBUS, S.A.

E-mail : kubus@kubus-sa.com

Introducción

La Tecnología se define como la ciencia aplicada, o el método científico para obtener un objetivo práctico¹. La necesidad de optimizar al máximo la producción, así como mejorar la calidad del producto final han impulsado la investigación en el campo de la reproducción. El desarrollo e incorporación de nuevas tecnologías denominadas Tecnologías de Reproducción Asistida (TRA), tiene un interés creciente dentro de los sistemas de producción porcina actuales. Como cualquier otra tecnología, el uso de TRA está condicionado por el beneficio real y el costo².

Entre las TRA que hoy en día son aplicables en la producción porcina tenemos:

1. Congelación de semen para rentabilizar los reproductores de gran valor genético y crear bancos de semen con dosis suficientes para abastecer las explotaciones en situaciones de prohibición de movimiento de animales y semen.
2. Sexaje de semen para la programación de la producción de machos o hembras y acelerar la mejora genética.
3. Inseminación Artificial Intrauterina que permite depositar el semen cerca del lugar de la fecundación.

En este trabajo se muestran los resultados y efectos de estas TRA sobre la gestión de los Centros de Inseminación Porcina.

Situación actual de las nuevas tecnologías de IA

1. Congelación de semen de porcino.

Desde que en 1975 Pursel y Johnson establecieran la metodología para la congelación de semen de porcino en píldoras, y Westendorf y cols. la técnica de la maxi-pajuela, ambas han sido y siguen siendo, con ligeras modificaciones las bases de los protocolos actuales de congelación^{3,4} (Cuadro 1).

La reducida fertilidad y prolificidad de los espermatozoides crío preservados de porcino tras la IA se deben a⁵:

- Los cambios estructurales y funcionales que sufren los espermatozoides durante el proceso de crío preservación;
- La disminución de la funcionalidad que dichos espermatozoides tienen en el tracto genital de la cerda;

- Las peculiares características anatómicas del aparato genital de la cerda que dificultan a los espermatozoides poder alcanzar el oviducto;
- La mala calidad de los embriones producidos que condiciona su posterior viabilidad.

Cuadro1. Protocolo de congelación de semen de verraco.

<u>Características comunes:</u>
<ul style="list-style-type: none"> ▶ Equilibración previa a la centrifugación (23°C y 15°C) ▶ Concentración del semen por centrifugación y eliminación del plasma seminal ▶ Congelación a una concentración elevada de spz. ▶ Adición de bajas concentraciones de glicerol

Actualmente, la IA con semen congelado en la producción porcina queda reducida a programas de mejora genética debido principalmente a que los resultados de fertilidad y prolificidad están un 10-20% y 1-2 lechones respectivamente, por debajo de los obtenidos con semen refrigerado. Estos resultados difieren entre razas e incluso entre eyaculados de un mismo individuo^{5,6,7}.

El daño estructural que sufren los espermatozoides durante la congelación, además de disminuir su supervivencia en el tracto genital de la cerda y el número de embriones que se producen, tiene un efecto negativo sobre el desarrollo y viabilidad de dichos embriones^{5,6,8}.

Los estudios actuales para mejorar los resultados con semen congelado tienen como objetivos mejorar los procesos de congelación de los espermatozoides y garantizar el número suficiente de espermatozoides con capacidad fecundante en el momento de la ovulación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estrategias para mejorar los resultados con semen congelado.

<p>1. Optimización del método de congelación</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Sistemas de envasado: FlatPack, congelar mayor volumen y hacer más uniforme el proceso⁹. ▶ Tiempo de enfriamiento no superior a 3 horas¹⁰ ▶ Centrifugado, disminuir el tiempo y aumentar la velocidad¹¹
<p>2. Selección de verracos de buena congelabilidad espermática</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Identificación rápida de individuos con buena capacidad de conservación. No existe correlación entre fertilidad en fresco y congelado^{9,10}.
<p>3. Deposición de los espermatozoides lo más cerca del oviducto</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Inseminación intrauterina profunda¹³
<p>4. Predecir el momento de la ovulación e inseminación</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ Ecografía del ovario^{5,14}

Aunque los últimos estudios y modificaciones en la técnica y aplicación de semen congelado han mejorado significativamente los resultados de fertilidad y prolificidad (Tabla 1), las investigaciones deben continuar para minimizar los daños de la congelación sobre la célula espermática, así como encontrar nuevos métodos para valorar la viabilidad y capacidad fecundante del semen descongelado.

Tabla 1. Fertilidad y prolificidad con semen congelado de verraco.

	IA tradicional (5×10^9 spz/dosis)¹⁵	IA intrauterina profunda (1×10^9 spz/dosis)¹⁶
Nº cerdas IA	190	49
Fertilidad a parto (%)	62,60	77,55
Tamaño de camada	9.01	9,31

2. Sexaje de semen.

La determinación del sexo de la descendencia antes del nacimiento tiene un gran interés económico, principalmente para las empresas de genética ya que podrían programar sus producciones hacia línea macho o hembra de acuerdo a la demanda del mercado y por otro lado acelerar los programas de mejora genética^{17,18}.

Los métodos para sexaje de semen se clasifican en dos grupos: los basados en las características físicas o cinéticas y aquellos que actúan sobre las diferencias nucleares de los espermatozoides. Estos últimos han dado resultados satisfactorios al obtener poblaciones purificadas de espermatozoides X/Y por determinación del contenido de ADN. El espermatozoide que transporta el cromosoma X es más grande y contiene más ADN que el espermatozoide que transporta el cromosoma Y (Tabla 2).

Tabla 2. Diferencias entre espermatozoide X e Y¹⁹.

Basado en esta teoría, se ha desarrollado un método para el sexaje espermático denominada Bestville Sperm Sexing Technology (BSST) que utiliza el corte por citometría de flujo para separar los espermatozoides X e Y²⁰. La citometría de flujo es todavía impracticable para incluirla dentro de los sistemas tradicionales de I.A., debido al escaso número de spz que pueden ser separados. Con los equipos de citometría actuales se puede tener un rendimiento de 300.000 – 400.000 spz X o Y a la hora. Estas bajas tasas de separación se deben a la necesidad de alcanzar una elevada pureza (90%) de las poblaciones espermáticas. La incorporación de nuevas sustancias a los medios de recogida y avances técnicos en los citómetros de flujo han generado un procedimiento que permite obtener hasta 7 millones de

espermatozoides viables por hora, con una pureza de alrededor del 80%^{28,29}. Esta combinación entre el rendimiento y la pureza siempre están equilibradas en los sistemas de separación. Incrementos en el rendimiento van en detrimento de la pureza y viceversa.

El sexaje de semen no se realiza actualmente en los centros de inseminación convencionales ya que requiere un equipamiento, citómetro de flujo, tremendamente sofisticado que necesita de personal especializado para su manejo y de, incluso, unas instalaciones con unas características especiales en cuanto a temperatura, luminosidad etc.

Estos espermatozoides sexados pueden ser utilizados en la producción in vitro de embriones o en inseminación intrauterina profunda con ciertas garantías de éxito. Asimismo, se han obtenido nacimientos tras la inseminación con espermatozoides separados mediante citometría de flujo y congelados³⁰. Probablemente, en los próximos años, se asista a una penetración de esta tecnología en la producción animal especialmente destinada a animales de alto valor económico y/o genético si se resuelven los problemas ligados a la inseminación (disminución del número de espermatozoides por dosis).

3. Inseminación Artificial profunda.

La industria porcina busca una forma de optimizar la productividad de los verracos destinados a la IA. La tendencia actual en la IA porcina es reducir el número de espermatozoides por inseminación y en esta línea se están desarrollando nuevas técnicas para la aplicación del semen cerca del lugar de la fecundación. Actualmente, es posible reducir la concentración de la dosis seminal con la IA tradicional llegando a los 2 mil millones de espermatozoides por dosis sin que se afecte la fertilidad y prolificidad²¹.

Para que tenga lugar la fecundación no es necesaria la presencia de un número elevado de espermatozoides viables en la unión útero-tubárica (UUT) UUT²². Los trabajos de Rath y cols. (1999) demostraron que mediante la inseminación intrauterina profunda, en la cual 20 millones de espermatozoides son depositados quirúrgicamente, se obtienen unas tasas de gestación equiparables a cuando se depositan 200 o 1000 millones. El inconveniente de esta técnica era la necesidad de realizar cirugía para la IA.

En los últimos años se han desarrollado dos nuevas técnicas no quirúrgicas para depositar el semen al final del cuerno uterino (Inseminación intrauterina profunda)^{13,24,25} o en el cuerpo uterino (inseminación postcervical)^{21,23}. La inseminación intrauterina profunda (IUP) consiste en un catéter flexible de 1,5 metros de longitud que permite depositar 150 millones de espermatozoides en un volumen de 7,5 ml al final del cuerno uterino. En el caso de la inseminación postcervical (IPC) la cánula pasa a través del cervix y llega hasta el cuerpo uterino utilizando hasta 500 millones de espermatozoides en un volumen de 30 ml²³ o 1000 millones en un volumen de 80 ml²¹. Los últimos resultados obtenidos con las distintas técnicas aparecen en la tabla 3 y demuestran que es posible disminuir el volumen y la concentración de la dosis seminal sin que se afecte la fertilidad y prolificidad.

Tabla 3. Fertilidad y prolificidad con la inseminación intrauterina profunda (IUP) y la post-cervical (IPC).

	IUP ²⁴	IPC ²¹	IPC ²⁶
Concentración (x 10⁶ spz/dosis)	50	100	100
Volumen (ml/dosis)	5	80	33
Fertilidad a parto (%)	92.3	87.0	86.3
Tamaño de camada	9.41	10.9	12,4

Gestión del CIA según las nuevas tecnologías.

La puesta a punto de estas nuevas tecnologías y sus resultados en las pruebas de campo, nos hace suponer que de una forma más o menos rápida van a ir siendo aplicadas por un mayor número de ganaderos o empresas dedicadas a la producción porcina.

Este hecho hará que, indudablemente, se produzcan cambios en la gestión y forma de organizar el trabajo en los centros de inseminación actuales diseñados para la producción de dosis seminales de 80 – 100cc. con 3.000 millones de espermatozoides.

Veamos como se puede ver afectada la producción de dosis seminales con la aplicación de estas nuevas tecnologías.

1. Congelación de semen de porcino.

Actualmente el empleo de semen congelado en los programas de inseminación artificial de porcino tiene importantes limitaciones respecto al semen refrigerado, principalmente (1) menor rentabilidad de los verracos, (2) baja fertilidad y (3) reducida prolificidad⁵.

Pese a todo esto, la posibilidad de utilizar la inseminación artificial con semen congelado nos permite cubrir algunas de las limitaciones inherentes al semen fresco o refrigerado. Así, entre sus ventajas podemos citar:

- ***Rentabilizar al máximo aquellos reproductores de gran valor genético.*** Normalmente en nuestros centros de inseminación conviven machos finalizadores con abuelos o bisabuelos de las diversas líneas genéticas. Si observamos el ranking de producción, casi siempre, los verracos menos rentables son los dedicados a genética. La explicación a este hecho es que debido a la propia idiosincrasia de los núcleos genéticos que deben controlar el nivel de consanguinidad de la población, la gran mayoría de las veces tenemos que extraer un macho de una determinada línea para producir, únicamente, 8 –10 dosis, cuando podríamos haber obtenido 25 ó 30. Utilizando la técnica de congelación podemos someter a estos machos a un ritmo de recogidas preestablecido, por ejemplo una extracción semanal, congelar todo el eyaculado e ir suministrando, posteriormente, las dosis que nos pida el núcleo genético, quedando el resto en el banco de semen del centro. Esto, además, permite a los centros de selección aportar la máxima variabilidad genética a las valoraciones rutinarias y periódicas que se realizan para el cálculo de los valores genéticos de los animales (BLUP).
- ***Fomento del comercio internacional de dosis seminales.*** El movimiento de animales vivos entre países cada vez es más difícil, por motivos sanitarios y por las limitaciones al transporte de animales impuestas por, las cada vez más numerosas, leyes de bienestar animal. El transporte de semen congelado no plantea más problema que el propio del manejo del Nitrógeno Líquido, aunque ya están disponibles otras posibilidades como la utilización durante el transporte de tanques de Nitrógeno Seco que facilitan el manejo.

- **Creación de bancos de semen.** En este apartado podemos ver 3 utilidades bien distintas:
 - Bancos de reserva genética. Donde se mantendrán congelados eyaculados de los animales más sobresalientes de cada línea, lo que permitirá su utilización varios años después con el fin de incorporar nuevos genes a una línea genética, medir el progreso genético tras varias generaciones o reconstruir un programa genético ante cualquier eventualidad que obligara a su eliminación.
 - Bancos de suministro. Con dosis suficientes para abastecer las necesidades de las explotaciones en aquellas situaciones en las que se prohíbe la movilidad de los animales, situaciones frecuentes en la especie porcina y normalmente relacionadas con brotes infecciosos. En este caso, no haría falta tener congeladas un gran número de dosis, sino sólo para cubrir las necesidades de 8 – 10 días, ya que este periodo de tiempo nos permitiría entrar en contacto con otros centros de inseminación nacionales o internacionales y organizar nuestro suministro de dosis mientras el centro esté inmovilizado.
 - Bancos de dosis de espermatozoides manipulados: sexados, transgénicos, etc. Esta posibilidad hoy día todavía no es factible, pero en los próximos años puede ser realidad.
- **Optimización de la gestión y operatividad de los centros de inseminación artificial.** En la actualidad, con el sistema tradicional de producción de dosis seminales el horario de entrada y las tareas realizadas diariamente en los CIAS vienen condicionados por el número de dosis que hay que producir cada día y que varía enormemente, como podemos ver en la tabla 4:

Tabla 4.

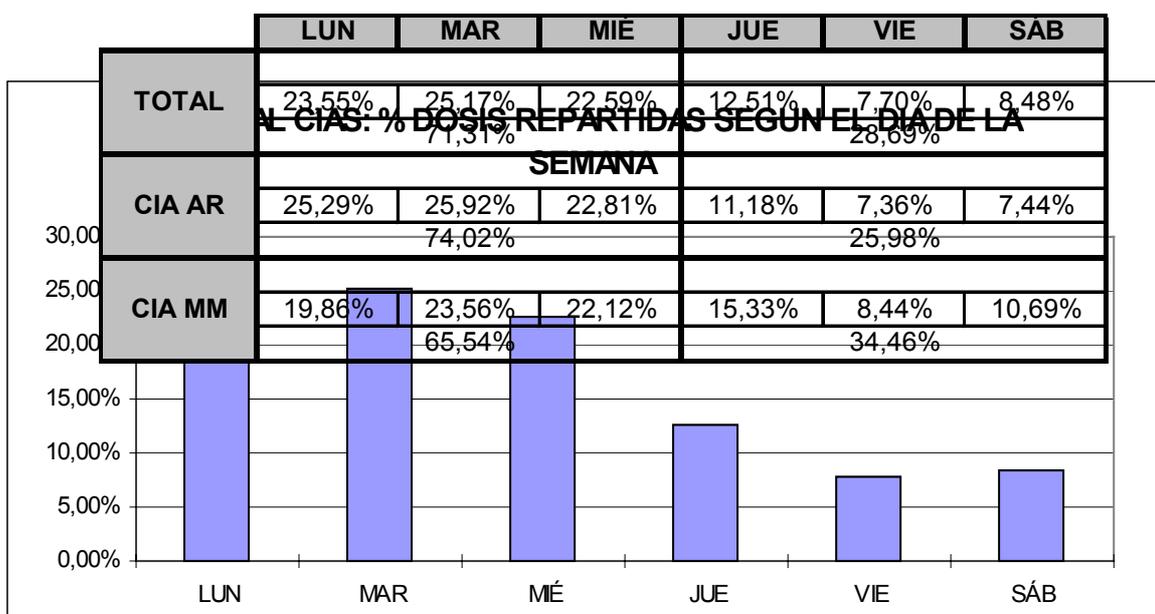


Figura 1.

Como se puede apreciar en la figura 1, en los 3 primeros días de la semana se producen más del 70 % de las dosis de toda la semana, lo que hace que las tareas en el CIA sean completamente distintas unos días y otros, así encontramos un rango de entrada al centro que va desde las 3,45 de la mañana hasta las 5,45 según los días y una variabilidad importante en las tareas realizadas cada día, estando los tres primeros días de la semana dedicados, prácticamente en su totalidad, a la producción de dosis y los tres días restantes a las labores de limpieza, mantenimiento y manejo de los animales.

Esta situación puede cambiar radicalmente con la producción de dosis seminales congeladas, donde podemos establecer unos ritmos de recogida fijos para cada uno de los animales y actuar independientemente de las peticiones diarias de semen. Esto hará que se pueda trabajar en unos horarios más racionales y sin la “presión” de tener las dosis preparadas a una hora determinada. Además se podrán planificar las tareas diarias con una mayor anticipación y de una forma más coherente a las necesidades de cada empresa, pudiendo, incluso, el no producir dosis en determinados momentos (vacaciones del personal, días de fiesta, motivos sanitarios, manejos especiales, etc) sin que esto suponga cesar en el suministro de dosis a nuestros clientes.

En los centros multirraciales permitirá un mejor aprovechamiento de los verracos, ya que, a menudo, se da el caso de que nos faltan unas pocas dosis de una determinada raza, lo que nos obliga a realizar una nueva extracción que no vamos a aprovechar completamente, y nos sobran dosis de otra raza que van a ser desaprovechadas al no producirse.

Una ventaja importante de la producción de dosis crío preservadas es el poder minimizar el problema de la estacionalidad reproductiva, sobre todo en zonas con climatología tropical. Por todos es conocido el efecto de las altas temperaturas sobre la producción seminal (figura 2):

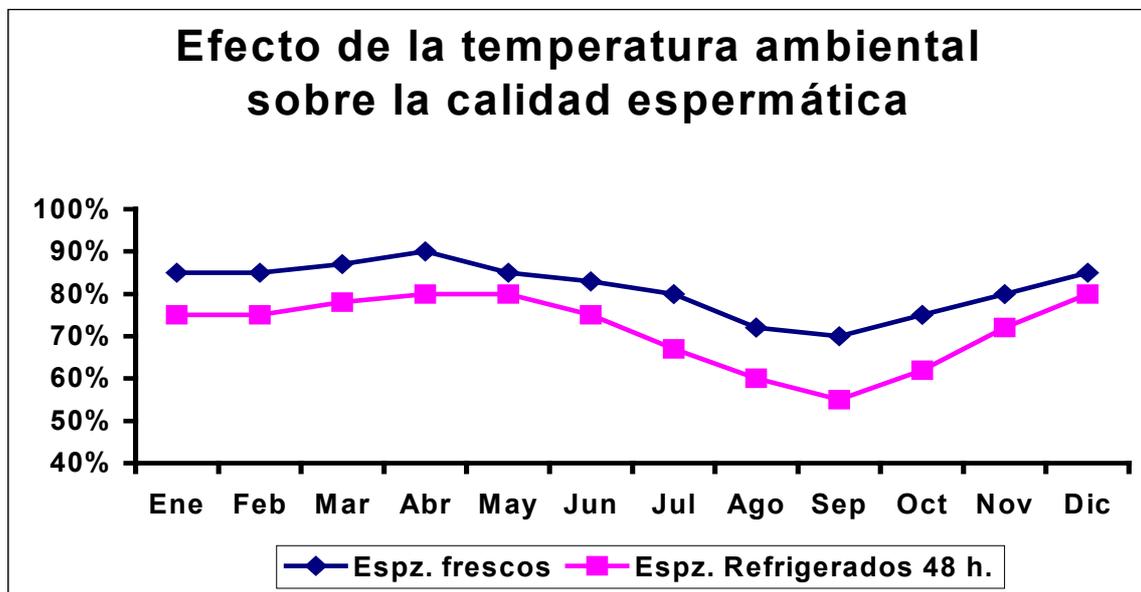


Figura 2.

La calidad espermática baja considerablemente desde mitad del verano hasta inicios del otoño, sobre todo cuando se trata de espermatozoides conservados 48 horas. Este efecto podría ser superado mediante la producción de dosis seminales congeladas, ya que durante estos meses se podría obviar la producción de dosis y utilizar aquellas producidas en los periodos más frescos y de mejor calidad espermática.

Otro punto a tener en cuenta, sobre todo en los centros que tienen rutas de reparto que diariamente o varios días a la semana distribuyen las dosis a las granjas, es el cambio que se producirá en estos sistemas de reparto. Con la utilización de dosis congeladas, el ganadero podrá disponer de un tanque de Nitrógeno líquido con dosis suficientes para 1 mes, 6 meses ó 1 año lo que hará que los sistemas actuales de reparto no tengan sentido. Sin embargo, habrá que crear otro servicio, el de distribución de Nitrógeno líquido para los tanques de conservación que se encuentren en las granjas. Este nuevo servicio, creemos, no debe quedar en manos de los ganaderos sino que, para evitar problemas, deberá ser ofrecido y garantizado por el propio centro de inseminación.

Indudablemente, para la producción de dosis seminales crío preservadas habrá que adaptar nuestros laboratorios a los equipamientos necesarios para este tipo de producción: cámara de estabilización, centrífuga, biocongelador, máquina de llenado y sellado automático de pajuelas, etc.

2. Inseminación artificial profunda.

El efecto de esta técnica, en cualquiera de sus dos variantes, inseminación postcervical o inseminación intrauterina profunda, sobre un centro de inseminación es el mismo, reducción en mayor o menor medida del número de machos necesarios para producir el mismo número de dosis:

- ***Inseminación postcervical.*** El utilizar dosis de 1.000 ó 500 millones de espermatozoides por dosis, supone disminuir el número de machos a 1/3 ó 1/6 del censo actual. Esto hace que si actualmente obtenemos una producción de 1.500 dosis por macho y año, en un futuro se podrá llegar a 4.500 ó 9.000 dosis por macho y año²⁶.
- ***Inseminación intrauterina profunda.*** En este caso las dosis son de 150 millones de espermatozoides, lo que implica una reducción, en teoría, de hasta 20 veces en el número de machos necesarios y obtener producciones de hasta 30.000 dosis por verraco y año²⁷.

La adopción de cualquiera de estas técnicas por parte de un centro de inseminación y la consiguiente reducción en el número de machos conllevará cambios en la estructura y funcionamiento de los mismos:

- ***Reducción del número de plazas de alojamiento.*** Dado que la necesidad de verracos será mucho menor se podrá acceder de manera más fácil a animales de alto valor genético y distribuir su potencial genético entre mayor número de ganaderos que, además ganarán en uniformidad de su producto final ya que toda su producción podrá provenir de un único o de un reducido grupo de machos de características similares. Esto que para los centros de inseminación es una indudable ventaja, supone un grave problema para las empresas de genética que verán reducidas sus ventas de machos para inseminación, exigiéndoseles, además, una mayor calidad genética en los animales que comercialicen.

- **Reducción del personal necesario para atender el centro.** Tanto por el menor número de machos que hay que atender como por la reducción en el número de extracciones y, por lo tanto, de contrastaciones seminales que hay que realizar diariamente. Esto supone una disminución del tiempo requerido para la obtención del semen, la contrastación y la preparación de las dosis seminales.
- **Cambios en los sistemas de envasado.** Ya que hay que hacerlos más adecuados a los requerimientos de estas técnicas, 30 ml en la IPC y 5 ml en la IUP.
- **Optimización de los horarios de trabajo.** Al no tener que realizar tantas extracciones se podrá empezar a trabajar algo más tarde o quizá, lo que es más interesante, mantener los horarios actuales pero adelantar la salida de los repartos. Las dosis seminales estarán en las granjas a una hora más temprana, facilitando, así, las tareas de inseminación, sobre todo, en las de un censo de reproductoras elevado.

En resumen, las ventajas de la aplicación de estas técnicas son:

- Reducción de los costes de producción de las dosis seminales.
- Mejor aprovechamiento de los verracos elite.
- Reducción del retraso genético entre generaciones de un programa o esquema de selección.
- Al acceder un mayor número de ganaderos a una genética superior, y, por lo tanto, obtener mejores precios por su producto en el mercado, puede contribuir a establecer una relación más estrecha entre el ganadero y los centros de inseminación.
- Aplicación de semen congelado o sexado.
- Mayor uniformidad y homogeneidad de los animales producidos.

Como desventajas podemos citar:

- Mayor coste de los catéteres y sondas de inseminación.
- Adaptación de los ganaderos a una nueva técnica más sofisticada.
- En países con alta rotación de personal hace necesario el entrenamiento constante.
- Pérdida de imagen de la ganadería por la utilización de “técnicas invasivas”.

Impacto económico de las nuevas tecnologías.

A continuación veremos el impacto económico de la aplicación de estas técnicas en un centro de inseminación.

1. Congelación de semen de porcino.

Considerando las siguientes premisas para el semen congelado en comparación con el semen fresco o refrigerado (n indica los resultados con semen fresco o refrigerado):

- Baja fertilidad (n-20%).

- Baja prolificidad (n-2 lechones).
- Pocas dosis producidas a partir de un eyaculado (n/2).

Podemos realizar los siguientes cálculos:

- Semen refrigerado: De un eyaculado, en condiciones normales, vamos a obtener 20–25 dosis seminales (3.000×10^6 espz/dosis), con lo que vamos a poder inseminar 10–12 cerdas y con una tasa de fertilidad del 80% obtener 8 – 10 cerdas gestantes.
- Espermatozoides crío preservados por sistemas tradicionales: Del mismo eyaculado anterior, y dado que en este caso las dosis son de $5-6.000 \times 10^6$ espz/dosis, vamos a obtener 10 – 15 dosis con las que podremos inseminar 5 – 7 hembras y con una fertilidad del 60% obtener 3 – 4 cerdas gestantes.
- Espermatozoides crío preservados y técnicas de inseminación profunda: Continuando el mismo esquema anterior, y como en este caso las dosis producidas requieren únicamente 1.000×10^6 espz/dosis podremos obtener 60 – 75 dosis con las que se podrán inseminar 30 – 37 cerdas que con una tasa de fertilidad del 67 % obtener 20 – 24 cerdas gestantes.

Observando los números anteriores, vemos que utilizando espermatozoides crío preservados, al menos, podemos doblar el número de gestaciones obtenidas a partir de un eyaculado, lo que posibilita su utilización a nivel práctico ya que disminuye los costes de producción que actualmente tenemos con el semen fresco. Aunque, actualmente, el equipamiento necesario para la producción de dosis congeladas supone el realizar inversiones altas en los centros de inseminación y dada la escasa difusión de esta técnica, estas inversiones son difícilmente amortizables, si su utilización se generaliza estará plenamente justificada la adquisición de estos equipos por parte de los centros de inseminación comerciales.

2. Inseminación artificial profunda.

Con la utilización de estas técnicas, la reducción en los costes de producción es evidente debido al menor número de verracos necesarios para la producción del mismo número de dosis. En la siguiente tabla se refleja el impacto de estas técnicas sobre los apartados de mayor incidencia en el coste final de la dosis:

	% SOBRE EL PRECIO FINAL DE LA DOSIS			
	Tradicional	IPC (1 x 10⁹)	IPC (0,5 x 10⁹)	IUP (0,15 x 10⁹)
Amortización machos	13,00 - 21,00	4,33 - 7,00	2,17 - 3,50	0,65 - 1,05
Mano de obra	20,00 - 25,00	10,00 - 12,50	10,00 - 12,50	10,00 - 12,50
Alimentación	6,00 - 8,00	2,00 - 2,67	1,00 - 1,33	0,30 - 0,40
Diluyente y otros	5,00 - 10,00	1,67 - 3,33	0,83 - 1,67	0,25 - 0,50
TOTAL	44,00 - 64,00	18,00 - 25,50	14,00 - 19,00	11,20 - 14,45

Hay que hacer constar que estos porcentajes pueden variar considerablemente según los precios de compra de cada producto y, sobre todo, según el precio de venta de las dosis y que todos los cálculos se han realizado en base a los precios medios que actualmente hay en España.

Con relación a la amortización de los machos hay que indicar que se realiza en 2,5 años y que los precios de compra estimados hacen referencia a verracos elite de alto valor genético.

En cuanto a la mano de obra se ha tenido en cuenta el coste total de empresa de todo el personal, encargado, especialistas y peones.

Para los cálculos de alimentación se ha estimado un consumo de 3 Kg de pienso de machos de alta producción por verraco y día.

Finalmente, indicar que en el apartado de diluyente y otros se incluye el consumo de pequeño material de laboratorio tal como vasos de recogida, filtros, pipetas, portas, cubres, etc. Dada la amplia gama de diluyentes que hay disponibles en el mercado, con la consiguiente diferencia de precios, en este apartado se pueden encontrar variaciones mucho mayores.

Conclusiones

Los avances realizados en los últimos años para desarrollar y mejorar las nuevas tecnologías de inseminación artificial hacen que se estén introduciendo, poco a poco, en la rutina diaria de algunos centros de inseminación, los cuales han debido adaptarse a los nuevos requerimientos de las mismas. De todas formas, para su implantación definitiva todavía quedan unos años en los que se deberá trabajar en la mejora de dichas técnicas y en la adaptación práctica de las mismas a las condiciones del trabajo en el campo, tanto en los centros de inseminación como en las granjas.

La separación de espermatozoides mediante citometría de flujo necesita estandarizarse aún más (mediante el incremento en los rendimientos de separación), al tiempo que se desarrollan mejoras en metodologías como la congelación de espermatozoides, incremento en la supervivencia espermática postseparación, inseminaciones con bajo número de espermatozoides y producción in vitro y transferencia no quirúrgica de embriones. Probablemente, en los próximos años, asistamos a una penetración importante de esta tecnología en la producción animal.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Departamento de Patología animal (Reproducción y Obstetricia) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia por la información facilitada para la realización de este trabajo.

Referencias.

1. Rodibaugh, M.T. (2001). *Science and technology 2001: Clear goals or black holes?*. In: Proceedings of American Association of Swine Veterinarians, 2001.
2. Althouse, G.C. (2000). Applicable technologies for gene transfer in swine. In: Proceedings of American Association of Swine Veterinarians, 2000.
3. Pursel, V.G y Johnson, L.A. (1975). *Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure.* J.Anim. Sci., 40:99-102.
4. Westendorf, P.; Rochter L.; Treu, H. (1975). *Zur tiergefrierung von ebersperma. Labor un besamunsergebnisse mit dem hulsenberger palletten verfhren.* Dtsch. Tierarztl. Wocchenschr., 82:261-267.
5. Roca, J; Carvajal, G.; Vázquez, J.M.; Lucas, X. y Martínez, E. (2001). *Criopreservación espermática en la especie porcina.* In: Proceedings del VIII Simposium Internacional de Reproducción e I.A. Porcina .pp13-29.
6. Bertani, G.R.; Curtis, E.F.; Fialho, F.B.; Rubin, M.I.B.; Wentz, I y Goncalves, P.B.d. (1996). *Periovalutary insemination with fresh or frozen semen on embryo viability and early pregnancy rate in gilts.* Reprod. Dom. Anim., 31:307-308.
7. Lleó, B. (2000). *Efecto del proceso de congelación sobre las características del semen de verraco y el inicio del desarrollo embrionario (5 días).* Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. U.C.M. Madrid.
8. Martín Rillo, R.; Pintado, B.; De Alba, C.; Sánchez, R.; García, P.; Corcuera, D y Artiga, C. (1996). *Effect of cooled and frozen boar semen on embryo development.* Reprod. Dom. Anim., 31:309-310.
9. Eriksson, B.; Rodriguez-Martínez, H. (2000). *Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flatpacks and maxi-straws.* Anim. Reprod. Sci., 63:205-220.
10. Eriksson, B.M.; Vazquez, J.M.; Martínez, E.; Roca, J.; Lucas, X.; Rodriguez-Martínez, H. (2001). *Effect of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawd boar spermatozoa.* Theriogenology, 55:1593-1605.
11. Carvajal, G.; Cuello, C.; Ruiz, M.; Lucas, X.; Vazquez, J.M.; Martínez, E; Roca, J. (2001). *Effect of the centrifugation regimes on the viability and penetrability of frozen-thawed boar spermatozoa.* Theriogenology, 55:302.
12. Roca, J; Lucas, X.; Gil, M.A.; Vázquez, J.M.; Carvajal, G. y Martínez, E. (2000). *Motility and in vitro penetrating ability of cooled and frozen-thawed spermatozoa from identical boars.* In: Boar semen preservation IV, p.260 (Ed. L.A. Johnson and H.D. Guthrie). Allen Press, Inc., Lawrence, KS, USA.
13. Martínez, E.A.; Vázquez, J.M; Roca, J.; Lucas X.; Gil, M.A.; Parrilla, I.; Vázquez, J.L. (2000). *Deep intrauterine insemination in sows with a low number of spermatozoa: a new and simple procedure.* Theriogenology Vol 55 (1):.248.
14. Soede, NM; Wetzels, CCH; Zondag, W.; de Koning, MAI; Kemp, B. (1995). *Effects of time insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate an access sperm count in sows.* J. reprod. Fertil., 104: 99-106.

15. Hofmo, P.O.; Grevle, I.S. (2000). *Development and commercial use of frozen boar semen in Norway*. In: Boar semen preservation IV, pp.71-86 (Ed. L.A. Johnson and H.D. Guthrie). Allen Press, Inc., Lawrence, KS, USA.
16. Roca, J; Martínez, E.; Vázquez, J.M.; Vázquez, J.L.(2000). *Cryopreservation of pig spermatozoa. New trends for its commercial application*. Workshop 3: New strategies in semen preservation and insemination in pigs. Fifth Annual ESDAR Conference. Prague.
17. Martínez, E.A.; Vázquez, J.M; .L.; Roca, J; Lucas X.; Gil, M.A.; Parrilla, I. (1999). *Posibilidades prácticas del sexaje de espermatozoides en la especie porcina*. In: VI Simposium Internacional de Reproducción e IA porcina. Madrid, Mayo 1999. Pp55-62.
18. Vázquez, J.M; Martínez, E.A.;L.; Roca, J; Lucas X.; Parrilla, I. (2001). *Sex-sorting boar sperm: problems and possibilities*. Arch. Tierz., Dummerstorf 44(2001) Special Issue, 141-144.
19. De Alba , C. (2000). *Situación actual de la tecnología en inseminación artificial porcina*. In: Biocnología de la Reproducción Porcina, XVI Edición Cursos de verano de la Universidad de Teruel.
20. Johnson, L.A. (1999). *Mejoramiento y sexaje de semen por métodos hidrodinámicos*. Proc. VI Simposium Internacional de Reproducción e IA porcina. Madrid, Mayo 1999. Pp41-54.
21. Watson, P. (2001). *Deep insemination of sows with reduced sperm numbers does not compromise fertility: a commercially based field trial*. In: Sixth International Conference on Pig Reproduction, Columbia, USA p.135.
22. Rath, D.; Kruger, C.; Johnson, L.A. (1999). *Low dose insemination technique: how many sperm do we need for successful insemination?*. In: IV international Conference on Boar semen preservation. Beltsville, Maryland USA. pp. O13.
23. Gil, J. (2000). *Post-cervical insemination*. In: 16th International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne Australia, p 399.
24. Vázquez J.M; Martínez, E.A.; Roca, J; Vazquez, J.L.; Lucas X.; Gil, M.A.; Parrilla, I (2000). *A.I. in swine: new strategy for deep insemination with a low number of spermatozoa using a non-surgical methodology*. In: 14th international Congress on Animal Reproduction. Pp289.
25. Vázquez, J.M; Martínez, E.A.; Parrilla, I.; Cuello, C; L.; Gil, M.A.; Lucas X; Roca, J; Vazquez, J.L.; Didion, B.A.; Day, B. (2001). *Deep intrauterine insemination in natural post-weaning estrus sows*. In: Sixth International Conference on Pig Reproduction, Columbia, USA p.134.
26. Gil, J. (2001). *Inseminación Post-cervical*. In VIII Simposium Internacional de Reproducción e I.A. Porcina en memoria del Dr. Santiago Martín Rillo. Pp129-131.
27. Martínez, E.; Roca, J.; Vázquez, J.M.; Lucas, X.; Gil M.A.; Parrilla I.; Carvajal, G.; Cuello C.; Vázquez J.L. (2001). *Inseminación intrauterina profunda en la especie porcina: una nueva tecnología*. In XXXIV semana nacional del ganado porcino SEPOR 2001. Pp 123-137.
28. Rens W.; Welch G.; Johnson L.A. (1999). *Improved flow cytometric sorting of X-y Y.chromosome bearing sperm: Substantial increase in yield of sexed sperm*. In Molec. Reprod. Dev. 52: 50-56.
29. Rens W.; Welch G.; Johnson L.A. (1998). *A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X y Y.chromosome bearing sperm*. In Cytometry 33: 476-481.

30. Vázquez, J.M.; Martínez, E.; Parrilla I.; Roca, J.; Lucas, X.; Cuello C.; Gil M.A. (2001). *Avances en la separación de los espermatozoides de mamíferos mediante citometría de flujo*. In XXXIV semana nacional del ganado porcino SEPOR 2001. Pp 113-122.