

RESPUESTA A LAS TÉCNICAS REPRODUCTIVAS DE LAS RAZAS EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

RESPONSE TO REPRODUCTIVE TECHNIQUES OF ENDANGERED BREEDS.

Poto A.¹, Almela L.¹, Peinado B.^{1*}, Ruiz S.²

¹Equipo de Mejora Genética Animal. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). C/Mayor s/n. 30150 La Alberca, Murcia. * begona.peinado@carm.es

²Departamento de Fisiología. Universidad de Murcia.

Keywords:

Reproduction
Technology
Autochthonous
breeds
Artificial
insemination

Palabras claves:

Biología de
la reproducción
Razas autóctonas
Inseminación
artificial

Abstract

The present work describes the difficulty and the different responses of endangered breeds to reproductive biotechnological techniques. It also explains the situation of reproductive biotechnology, especially the currently applied aspects, with differing results in these small populations with respect to the social environment in which they are raised. In these unique settings the techniques ranged from the most simple and well-known techniques such as artificial insemination, to the most innovative techniques such as ovum extraction by means of guided suction by ultrasonography with ovum pick up (OPU). Other reproductive techniques, such as sexing semen are also mentioned. This last technique has not yet been tested in these endangered breeds, but it could be useful in near future. Some of the most innovative techniques have been used successfully by highly regarded scientific teams that belong to the Murcia University (Spain) as in the case of the obtaining of transgenic animals in commercial pigs.

Resumen

En este trabajo se muestran las dificultades y las diferentes respuestas de las razas en peligro de extinción, exponiendo la situación de la biotecnología reproductiva y, en concreto, la parte realmente aplicada, con los diferentes resultados recogidos en estas pequeñas poblaciones, dentro del entorno social donde se desarrollan. En condiciones muy particulares se están aplicando desde las técnicas más simples y conocidas, como la inseminación artificial, hasta las más novedosas como la obtención de ovocitos mediante aspiración guiada por ecografía. También serán citadas otras técnicas reproductivas, como el sexado de semen, que aunque no han sido ensayadas en estas razas amenazadas si que podrían ser útiles en un futuro próximo. Alguna de las más novedosas ya han sido ensayadas con éxito por equipos de reconocida solvencia científica de la universidad de Murcia, como es el caso de la obtención de animales transgénicos en porcinos comerciales.

Introducción

En el Sudeste español existen una serie de razas fruto de la biodiversidad mantenida durante siglos con el esfuerzo de ganaderos y criadores locales, y que según los casos han mantenido y mantienen altas producciones que las han hecho famosas. Tal es el caso de la cabra Murciano Granadina y la oveja Segureña como razas más conocidas y expandidas en la actualidad. Pero también se cuenta con razas en peligro de extinción como son la vaca Murciano Levantina, muy demandada por su capacidad de trabajo en los años anteriores a la mitad del siglo XX; el cerdo Chato Murciano portador de una materia prima que generó productos de gran consumo y responsable de la expansión de la floreciente industria cárnica de sudeste. Otras razas con menos incidencia económica, pero integrante de la biodiversidad del corral, son la gallina Murciana, el pavo Negro del Mediterráneo y el palomo de Pica o Deportivo Murciano. Además, otras razas de ovinos y caprinos pertenecientes a la cabaña autóctona española presentan buenos rendimientos en las zonas más feraces de la geografía murciana cumpliendo funciones de distinto calado en el ámbito socioeconómico y medioambiental (Poto *et al.*, 2000).

En concreto, las técnicas reproductivas que se utilizan son: Inseminación artificial en bovino, porcino y aves, la obtención de ovocitos en las especies bovina y porcina, la criopreservación de gametos, principalmente el gameto masculino, el manejo de los embriones tanto *in vivo* como *in Vitro*, y la conservación por frío de embriones, considerando aspectos de vitrificación y congelación. Las metodologías que están revolucionando consideraciones sociales por su impacto sobre los aspectos éticos son la clonación, la obtención de animales transgénicos y la inyección intracitoplasmática.

1) Inseminación artificial

La materia prima para la inseminación artificial debe de partir de animales que presenten todas las condiciones sanitarias exigidas por la normativa, pero además el desarrollo corporal, de los órganos genitales y los caracteres sexuales secundarios ha de estar completado y en armonía con lo que se espera de un buen reproductor. Esto conlleva un proceso selectivo individual y de conjunto del grupo de animales destinados a ser futuros reproductores. Este es el primer punto de choque de la tecnología en el caso de las razas en peligro de extinción, especialmente cuando la situación es crítica. En la mayoría de los animales que pertenecen a estas pequeñas poblaciones no se dan las condiciones de selección necesarias para ser declarado donante de gametos, y por lo tanto, estas exigencias deben de ser obviadas a menos que nos olvidemos de la raza. Aceptando como donante lo único y escaso que tenemos. Estos criterios van a ser los primeros limitantes para obtener los resultados que sobre el papel han sido estimados.

Las técnicas de obtención de gametos masculinos son sobradamente conocidas, habiendo evolucionado desde los paños y esponjas colocadas en la vagina de las yeguas, en la época prehistórica de la tecnología reproductiva de las tribus sumerias. Egipcios y árabes, también idearon métodos con el ánimo de sustraer gametos masculinos y, por tanto, la mejora genética y selectiva lograda en el ganado de guerra enemigo. Elementos y recipientes rígidos, de caucho y vidrio, también han sido colocados en la vagina al objeto de recoger el semen tras la monta natural, como la metodología de Roemmele (1932) y Dubois (1966). Pero el método más comúnmente aceptado se debe al método que aplica los criterios de Amantea, conocido como vagina artificial, elemento que cumple con las exigencias para producir la excitación en los sementales en cuanto a condiciones de temperatura, flexibilidad y textura semejantes a las que se producen en condiciones naturales, estimulando todos los corpúsculos erógenos del pene.

Pero además, estos aparatos se han ido adaptando a las condiciones anatómicas del órgano reproductor y al mantenimiento fisiológico del semen hasta su preparación y acondicionamiento para su aplicación. La capacidad espermicida de los materiales ha sido estudiada (Martín *et al.*, 1994), desechándose el látex y otros componentes, dando paso a toda una tecnología derivada de la industria del plástico que mejora los resultados.

Para eliminar el choque térmico en la recogida seminal se ha recurrido a recipientes en vidrio con doble pared donde se coloca agua atemperada, aunque en aras a la simplicidad sólo se recubre y protege todo el conjunto con una funda en guata que mantiene la temperatura en límites aceptables, disminuyendo la agresión que la luz y la temperatura externa pueden ocasionar al eyaculado.

En estos casos también existen problemas para cumplir con exactitud el protocolo de recogida seminal. Las razas en peligro de extinción generalmente están en manos de criadores poco profesionales con criterios de tenencia de los animales no coincidentes con las normas más racionales de conservación, siendo poco adeptos a desprenderse de los animales, aún temporalmente. Pero sí aceptan la aplicación de estas técnicas en sus instalaciones, normalmente precarias, con lo que las condiciones en la obtención de espermatozoides han de ser variadas en una adaptación necesaria a las circunstancias.

En el palomo la extracción de semen se realiza mediante la aplicación combinada de estímulos visuales, la cercanía de una hembra ante la que se representa un comportamiento específico y permitiendo el intento de monta, aunque momentos antes de que se realice se aplican al animal una serie de masajes en el área próxima a los genitales, que excitan al donante hasta que por una suave presión sobre el borde externo de la cloaca propicia la salida del eyaculado que finalmente es recogido con ayuda de una pipeta (Duchi *et al.*, 2008, 2009; Duchi, 2009). En el gallo no es necesario la presencia de la hembra pero debe estar bien entrenado y siempre debe de recibir estímulos y masajes a todo lo largo del dorso y cola, siguiendo en el momento final la misma presión sobre los bordes de la cloaca para que se propulsen los cuerpos fálicos y el eyaculado (Poto *et al.*, 2007a, b; Duchi *et al.*, 2008).

Muchos de los animales presentan mejores resultados cuando se prescinde de la vagina artificial, siendo suficiente la manipulación con la ayuda de guantes flexibles y finos que transmiten al pene los estímulos de presión y temperatura de la mano del operario como es el caso del método de recogida seminal ideado por Hancock & Howell en 1959 para la especie porcina.

Pero existen en todas las especies un número de ejemplares, a veces genéticamente interesantes, que no aceptan ninguna de estas tecnologías, rechazando la vagina artificial, la mano enguantada o potros con vagina incorporada, siendo incluso peligroso en la proximidad de los operarios. En estos casos es necesaria la utilización de métodos que burlen esta situación, como en las especies con eyaculación lenta en las que se aplica la monta natural sobre la hembra en celo, extrayendo el pene una vez penetrado en la vagina mediante forzado y recogida de la parte del eyaculado que aún quede por emitirse, o bien, utilizando técnicas más contundentes como es el caso de la aplicación del electroeyaculador.

La aplicación de estímulos eléctricos sobre los pares nerviosos del área lumbosacra permite la salida del pene, su erección y la eyaculación que es recibida en tubos de vidrio. Finalmente, también la recogida de semen a partir de lavados de epidídimo es de uso frecuente para animales de gran valor que son sacrificados o abatidos en jornadas de caza. En estos últimos casos los resultados finales, en cuanto a fertilidad se refiere, distan de ser los óptimos por razones obvias de tipo higiénico y contaminación de la muestra tanto con la polución del ambiente como por la mezcla de la muestra seminal con emisiones del aparato excretor (Evans y Maxwell, 1990; Chung, 1997; Reyes Moreno *et al.*, 2000; Reyes Moreno *et al.*, 2002; Galina y Valencia, 2006)

No obstante en las razas en punto crítico de extinción e incluso en otras menos amenazadas es preciso realizar estas operaciones con las consiguientes correcciones del método, como son la interposición de filtros que evitan la incorporación de suciedad o de elementos característicos del semen innecesarios en la preparación de las dosis seminales, es el caso del contenido gelatinoso del eyaculado de ciertas especies.

Es necesario hacer un esfuerzo sea cual sea la situación en que se encuentre el donante en cuanto a que reciba una alimentación adecuada al individuo, ponerlo en parque individual, pero permitiendo la visión de otros animales, siempre evitando que las inclemencias climáticas puedan incidir sobre ellos de forma agresiva. Los locales donde se ubiquen estarán siempre limpios y los animales también, poniendo especial interés en evitar los malos tratos y las incomodidades en la vida del donante. Es de sobra conocida la incidencia de los malos tratos sobre la producción seminal posterior.

En los albores de la inseminación artificial, cuando se utilizó semen fresco o refrigerado, se estimó esta técnica como un gran avance al poder enviar el material genético a distancia, sin contacto entre macho y hembra. Pero con la aparición de los diluyentes se puso en evidencia la ventaja que supone el servicio a muchas hembras con un sólo eyaculado, con lo que el número de sementales a utilizar disminuyó drásticamente; en el caso del bovino un toro puede producir más de quinientas dosis de semen. Pero lo que marcó una verdadera revolución fue la posibilidad de prolongar la vida útil extracorpórea de los gametos después de los estudios de Polge en 1949, cuando aplicó, en un afortunado error, el glicerol a un diluyente, en vez de fructosa. A partir de aquí la empresa dedicada a la mejora genética animal vio con regocijo como aumentaba la velocidad del progreso productivo en el mundo animal. Estos hechos fueron especialmente útiles para la conservación *in Vitro* de sementales de altísimo valor económico. Unos cuantos eyaculados han prolongado la vida genética útil muchos años después de muerto el animal.

En las últimas décadas del proceso histórico se ha trabajado para disminuir drásticamente el número de espermatozoides por dosis aplicable, puesto que sólo se requiere un gameto para conseguir la fecundación del ovocito. En la práctica eso se consigue con la aplicación de la inyección intracitoplasmática, técnica esta que tiene pocas posibilidades de ser utilizada en el medio productivo de forma masiva.

En realidad el número de gametos depositados por el macho va disminuyendo de forma natural por las barreras impuestas por los genitales femeninos en cuanto a pH vaginal, aparición de macrófagos tras las irritación uterina provocada por el semen; la eliminación por lavado uterino del líquido epididimario, la redistribución de los fosfolípidos de membrana y la reactivación metabólica que supone la hiperactividad del gameto capacitado. Al final sólo unos cuantos llegan al lugar en el oviducto donde sólo uno de ellos penetra el ovocito. Por lo tanto, el número de gametos por dosis de inseminación depende del lugar de deposición y la distancia que queda hasta el gameto femenino (Garde, 1992; Vázquez *et al.*, 2008; Vázquez, 2010). En los últimos años y con la llegada de nuevos instrumentos de inseminación el número de gametos ha bajado ostensiblemente, especialmente en la especie porcina. La deposición intrauterina profunda de los gametos ha dividido por cuatro el número necesario para dejar gestante a la cerda en celo. En caso del semen congelado hace que con sólo 1000 millones de espermatozoides descongelados se consiga la gestación cuando se hace la inseminación intrauterina profunda. La misma situación ya ocurrió en el caso de la inseminación de la vaca. En ésta los espermatozoides necesarios por dosis son de tan sólo unos millones, puesto que la parte más profunda del cuerno uterino se alcanza con facilidad. Esta reducción del número de gametos es mayor cuando se pasa a técnicas de inseminación por

laparoscopia donde la colocación del espermatozoide es cercana al ovocito y en algunos casos se citan sólo la necesidad de 300.000 gametos por dosis.

Otro de los acontecimientos de actualidad y que está tomando gran importancia es la utilización en inseminación artificial de semen sexado. La posibilidad de que todos los animales nacidos en una explotación tengan el mismo sexo, determinado con anterioridad a la preparación de la dosis seminal, supone una buena mejora económica en la empresa ganadera por la posibilidad de programar los productos finales que se van a utilizar. Pero además, en el proceso de recuperación de las razas animales y las pequeñas poblaciones supone el disminuir el tiempo del proceso a la mitad y, por tanto, la reducción sustancial del esfuerzo económico, sin olvidarnos del ahorro que supone en los bancos de germoplasma.

Pero aún se presentan varios problemas como son el alto coste del sistema, la alta cualificación de los operarios, la lentitud del proceso y algunas alteraciones que se producen en la célula consecuencia de la tinción fluorescente, esto último limita ligeramente la utilización de los espermatozoides separados en algunos procesos.

2) Criopreservación espermática

Pero la técnica que más esfuerzos ha requerido en los últimos 60 años ha sido la congelación de semen. Esta técnica requiere en la mayoría de las especies de sementales seleccionados según la congelabilidad de sus gametos, cuestión que a veces no tiene relación directa con la reviviscencia espermática en los estudios *in Vitro* postdescongelación. Estos criterios deben de ser revisados en el caso de las poblaciones en peligro de extinción, donde el eyaculado va dirigido preferentemente a los bancos de germoplasma. En estos casos los espermatozoides descongelados no tienen porque ser utilizados solamente en la inseminación artificial convencional. La inyección intracitoplasmática es otro ejemplo de utilización en recuperación genética.

El proceso de congelación de gametos masculinos conlleva una serie de agresiones celulares necesarias en la preparación de las dosis seminales. Existen una serie de puntos críticos que pueden producir alteraciones de tipo físico químico sobre la membrana plasmática, el acrosoma, el metabolismo celular, la estructura e integridad de la carga de ADN, etc.

Estos puntos críticos afectan de forma diferente dependiendo de la especie que consideremos pero en general encontramos daños en:

- * La eliminación del plasma seminal, en semen caprino y porcino para sustituirlo por diluyente final. Esto impide una actividad exagerada del plasma seminal en el espermatozoide, sobre todo con el paso del tiempo. Existe actividad enzimática de tipo lipasa que es capaz de seguir actuando incluso a muy bajas temperaturas. Por todo esto, el semen debe de ser lavado por centrifugación suave pero suficiente para separar las células del plasma.

- * El diluyente seminal no sólo tiene la función de aumentar el volumen del eyaculado, también tiene que nutrir y proteger la célula. En este sentido el tiempo transcurrido desde su preparación, la forma de almacenamiento hasta su uso y la calidad de las materias primas usadas en su preparación influyen sobre el resultado final.

El tipo de diluyente utilizado está teniendo mucha importancia, cada especie tiene requerimiento diferentes; nos atreveríamos a decir que son diferentes en cada raza y cada individuo. En la especie equina se están diseñando diluyentes (Brass, 2001; Miró y Ocaña, 2006; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2009; Samper y Plough, 2010) destinados a un mismo semental. Incluso se están contemplando las diferencias entre distintos momentos reproductivos (edad, estación, alimentación recibida por el animal).

- * El crioprotector utilizado también tiene efectos sobre todo en la formación de cristales en el interior de la célula durante el proceso de congelación, de tal forma que se produce la desecación parcial debido a fenómenos osmóticos. En la actualidad se conocen muchos tipos de crioprotectores que se clasifican según el grado de penetración a través de la membrana celular y su peso molecular, siendo particularmente importante en el caso de los protocolos de criopreservación en embriones y ovocitos. Pero el porcentaje de crioprotector tiene relevancia en la estructura final del espermatozoide descongelado, detectándose anillos acrosómicos alterados en mayor medida al aumentar los porcentajes de crioprotector. Porcentajes bajos de glicerol disminuyen la reviviscencia espermática por lo que en los protocolos actuales se ha optado por añadirlo a la mezcla semen diluyente en varias sesiones con lo que el aumento osmótico alcanza las mismas cuotas pero de forma suave y lenta.

- * El descenso térmico es obligatorio para prolongar la vida genética útil de la célula. Las reacciones metabólicas son termodependientes, ralentizándose a medida que la temperatura disminuye, siendo prácticamente nulas a -196 ° C, punto de ebullición del nitrógeno líquido. Existen diferencias biofísicas entre los gametos masculinos de las diferentes especies, tanto en la superficie como en el volumen total, la permeabilidad de la membrana y la

composición lipídica del conjunto. A este respecto hace más de 28 años que se condicionó la adecuada velocidad de congelación por la formación de cristales de hielo perjudiciales cuando la velocidad de congelación es muy rápida o la acumulación de solutos tóxicos cuando ésta es lenta (Mazur, 1984).

* La geometría del envasado es otro factor muy influyente porque la pérdida o ganancia de temperatura durante el proceso de congelación debe de llegar al mismo tiempo a todas las células. El cambio de estado desde líquido a sólido conlleva el desprendimiento de calor desde las células que se van congelando en las proximidades de las paredes del envase hacia las células del interior, produciendo aumentos de temperatura perjudiciales a nivel microcelular. En los últimos tiempos parece que se imponen los envases de tubos de 0,5 ml de capacidad, la composición del material en que están fabricadas también han sido ensayados, existiendo protocolos que utilizan polímeros plásticos, aluminio, e incluso formas más voluminosas, con lo que se complica tanto el proceso de congelación como el de descongelación. Éste último proceso es en el que se ha tenido mayor cuidado y estudio en las últimas dos décadas siendo las velocidades de ganancia de calor aplicadas en cortos espacios de tiempo. Según el tipo de envase la temperatura de descongelación propuesta es de 56° C durante doce segundos (Thilmant, 1997) en el caso del envase de 0,5 ml y de 80° C durante dos segundos en el caso de tubos de 5 ml, para semen congelado de la especie porcina.

En la preparación de los diluyentes destinados a las dosis seminales se hace necesario añadir antibióticos para impedir en lo posible la proliferación de gérmenes, patógenos o no, que podrían dañar la célula o transmitir alguna enfermedad. Por esto es obligatorio seguir las recomendaciones de las directivas en materia de sanidad en el comercio de semen, tales como la Directiva 90/429/UE y posteriores.

3) Manejo de los embriones tanto *in vivo* como *in Vitro*,

En las especies de animales domésticos se implementan programas de mejora y conservación, utilizando tanto la mejoría alcanzada por el macho como por la hembra, mediante la inseminación de reproductoras donantes para transferir sus embriones a una reproductora receptora que gestará y parirá a los descendientes genéticos de la primera. En general el proceso es idéntico para todas las especies, aunque el protocolo varía tanto por razones anatómicas como fisiológicas. Las dos hembras deben de situarse en el mismo momento reproductivo, aunque para mayor precisión la receptora debe de estar en el momento reproductivo que corresponde a la edad del embrión cuando en este se ha reactivado el metabolismo. En la donante se induce la superovulación y por tanto el estro, mientras en la receptora sólo se aplica un tratamiento de inducción del estro. Después de la inseminación de la donante se espera el tiempo necesario para recoger los embriones en el estadio propio para ser transferido; lo normal es retirarlos entre los cinco y ocho días, según la especie, para tener embriones en fase de mórula compacta o blastocisto.

La recogida de embriones se realiza por el método no quirúrgico en las especies de gran tamaño y por métodos quirúrgicos donde las circunstancias anatómicas impidan la manipulación. Luego del estudio y clasificación, los embriones serán colocados en la receptora o bien serán destinados al acondicionamiento para su custodia en el banco de germoplasma.

En estos casos se plantean varios problemas: de un lado las hembras donantes han de recibir varios tratamientos hormonales para repetir el proceso y la respuesta es diferente tanto entre individuos como entre tratamientos. También la recogida quirúrgica puede presentar problemas después de la primera intervención. El problema que se plantea a priori es que en las razas en peligro es difícil la elección de donantes que presenten ciclos reproductivos regulares.

En el mejor de los casos se obtienen media docena de embriones transferibles en promedio, y las dosis crecientes de productos folículo estimulantes no tienen correlación positiva con el número de embriones recogidos; de tal forma que dosis por encima del umbral máximo pueden dar una respuesta ovárica nula. También influye en esta respuesta la raza, el manejo, la edad de la donante, etc.

Los equipos dedicados a la transferencia de embriones deben tener mucha experiencia y estar bien entrenados para la comprensión de todo el proceso reproductivo y para el manejo de gran cantidad de medios, útiles y animales, debiendo estar todos las partes y elementos bien sincronizados para un buen resultado del proceso. La donante en el ganado bovino debe situarse en un lugar que impida movimientos bruscos, con potros de sujeción, que impida el peligro de los operarios, además de estar suficientemente sedados y anestesiados, aplicándose anestesia de conducción (epidural). Esto posibilitará la relajación suficiente de los genitales para aplicar una sonda de varias vías, pero que en definitiva permita el lavado de la parte craneal de cada cuerno uterino en un sistema de circuito cerrado, mediante la adaptación de un globo que clausura la luz de cuerno que se manipula. Una vez terminada la recogida de embriones en ese cuerno uterino se procede a la colocación del equipamiento en el otro cuerno para completar la extracción.

La aplicación de los embriones en las hembras receptoras se realiza con catéteres de mayor longitud que los utilizados para el depósito de esperma convencional, debiendo de situarlos en el lugar donde se esperaría que se encontraran según la edad de desarrollo, siempre en la parte más profunda y cercana a la unión útero-tubárica correspondiente al cuero uterino ipsilateral al ovario que presente un cuerpo lúteo bien conformado (Palma, 2001; Cabodevilla, 2001).

Todo ello se realiza después de haber estudiado la calidad microscópica del embrión según su morfología, disposición correcta de blastómeros, masa celular interna, trofoblastos, etc. Hay que tener en cuenta la parada metabólica que sufrirá el embrión por efecto de esta manipulación, sobre todo cuando entre la recogida y la recepción se procede a su congelación o vitrificación.

En los pequeños rumiantes ha sido muy utilizada la recogida quirúrgica de los embriones, mediante la colocación de sondas a través de la pared uterina o a través del oviducto, dependiendo del estadio en que se quieran obtener los embriones. En los últimos años se ha impuesto la extracción embrionaria por laparoscopia.

Cuando los embriones son destinados a su almacenamiento en banco de germoplasma deben de ser acondicionados en una pajuela luego de un proceso de deshidratación con crioprotectores, siguiendo los criterios fisicoquímicos propios de los protocolos de criopreservación celular. Existen numerosos protocolos para conseguir una crioconservación prolongada con poco daño para la célula embrionaria, y en los últimos años se han mejorado estos procesos, aumentando la velocidad de enfriamiento una vez acondicionado el embrión mediante los procesos conocidos como vitrificación embrionaria. La descongelación de los embriones también debe de adecuarse a una descongelación lenta seguida de una serie de lavados para disminuir los niveles tóxicos de glicerol o de otros crioprotectores.

Aunque todo esto ha variado sustancialmente con el empleo de métodos que combinan la ultradeshidratación con la aplicación de pérdida de calor de forma muy rápida. En la vitrificación clásica se envasan los embriones en pajuelas de 0,25 ml que permite una velocidad de enfriamiento de 2.500 ° C/minuto (Mazur et al, 1992), cuando se usa para el envasado pajuelas de sólo dos microlitros, método conocido como Open Pulled Straw, la velocidad de enfriamiento es muchísimo más alta, 18 000 ° C/minuto (Vajta, 1997). Ésta última proporciona mejores resultados en todas las especies.

4) La biotecnología reproductiva *in Vitro* está teniendo gran aceptación por su abundante uso en la especie humana y las repercusiones sociales que implica. En ganado bovino, sobre todo en ganado de producción láctea también se ha difundido su utilización. En definitiva esta tecnología comprende el proceso de maduración de ovocitos, desde la recogida hasta su cultivo y maduración, la fecundación o inseminación *in Vitro* de los ovocitos y, finalmente, el cultivo y desarrollo embrionario. Teniendo cada uno de estos procesos entidad suficiente para ser tratados por separados pero ajustaremos su descripción a este espacio limitado.

Para la obtención de ovocitos se recurre al menos, a tres fuentes de materia prima: ovarios de matadero, ovarios procedentes de castración y a la aspiración tras la punción ovárica ecoguiada.

En el primer caso, los ovarios son recogidos en el matadero libres del resto de genitales, transportados al laboratorio en líquidos de lavado y mantenimiento embrionario tipo PBS o en suero fisiológico, estas operaciones se realizan lo más próximas al momento del sacrificio del animal, no más de 10 horas y la temperatura de trabajo será cercana a los 18 -20 ° C. (Gardón, 1999; Gordon, 2006) Los ovocitos se recogen del ovario bien por aspiración o por corte con hoja de bisturí. En el segundo caso se lavará toda la superficie ovárica para arrastrar los posibles ovocitos que hayan quedado sobre la pared albugínea.

Otro de los métodos de obtención de ovarios es la castración, siendo necesaria la identificación de cada uno de los ovarios para el buen control genético de los embriones resultantes. Aunque ninguno de estos métodos es adecuado en caso de razas en peligro de extinción debido a que las reproductoras son destinadas a la reposición y aumento numérico poblacional y las que escasamente se sacrifican no alcanzan la categoría de donante; en el caso de la castración, sólo decir que a nadie se le ocurriría castrar a una hembra en peligro de extinción.

La técnica que en la actualidad se presenta como alternativa eficaz en la obtención de ovocitos es la aspiración guiada por ecografía, conocida como OPU, abreviatura del término Ovum Pick Up (Astiz *et al*, 2012a). Esta técnica está siendo utilizada sobre la raza bovina Murciano Levantina por un equipo compuesto por más de diez técnicos y donde se han seguido los protocolos hasta conseguir una gestación (Astiz *et al.*, 2012b).

En estas hembras bovinas se han realizado la extracción de ovocitos mediante técnicas preparatorias para OPU, utilizando al menos dos protocolos (Romero-Aguirregomez *et al.*, 2013). Los ovocitos aspirados se trasladan hasta los laboratorios, donde tras su valoración son sometidos a procesos de fertilización *in Vitro*, vitrificación y crioconservación. La aplicación de los embriones desvitrificados a hembras bovinas receptoras produce resultados esperanzadores que deben ser mejorados en el futuro.

En la tabla se muestran los resultados de los ovocitos recogidos por OPU después de dos tratamientos diferenciados para la eliminación del folículo dominante: La ablación folicular mecánica o la administración de GnRH en vacas de raza Murciana. En la primera columna se exponen los del tratamiento de eliminación mecánica donde el 52,56 % fueron clasificados como no aptos de tipo IV y V. Para los ovocitos obtenidos tras el tratamiento del folículo dominante con GnRH el porcentaje de ovocitos no aptos fue ligeramente menor, 49,53, aunque hubo un aumento de los ovocitos de tipo V maduros *in vivo* al igual que aumentó de forma significativa el tipo III para este último tratamiento (Ruiz *et al.*, 2013a,b).

Tabla 1. Eficacia de la ablación folicular y de la administración de GnRH (Dalmarelin®) sobre la producción y calidad de los ovocitos obtenidos por OPU en vaca Murciano-Levantina (*Efficiency of the follicular ablation and of the GnRH (Dalmarelin) administration on the production and quality of oocytes obtained by OPU in Murciano-Levantina cow*)

| Sesiones OPU (n) | RFD | GnRH |
|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | 9 | 9 |
| Folículos aspirados/sesión (X±SD) | 13.55 ±4.77 ^b | 18.77±5.22 ^{a*} |
| Ovocitos obtenidos/sesión (X±SD) | 8.66±5.07 | 11.88±4.78 |
| Ovocitos obtenidos (n,%) | (78/122) 63.93 | (107/169) 63.31 |
| Categoría de ovocitos (n,%) | | |
| Tipo I | (17/78) 22.79 ^{a*} | (12/107) 11.21 ^b |
| Tipo II | (8/78) 10.25 | (12/107) 11.21 |
| Tipo III | (12/78) 15.38 ^b | (30/107) 28.03 ^{a**} |
| Aptos para PIV (I, II y III) | (37/78) 47.43 | (54/107) 50.46 |
| Tipo IV | (35/78) 44.87 ^{a**} | (25/107) 23.36 ^b |
| Tipo V | (6/78) 7.69 ^b | (28/107) 26.16 ^{a**} |
| No aptos (IV y V) | (41/78) 52.56 | (53/107) 49.53 |

^{a,b} en la misma fila indican diferencias estadísticas. * P<0.05, **P<0.01.

El bajo número de animales utilizados no permiten objetivar los datos obtenidos, pero el nacimiento de al menos una ternera después de un procedimiento tan largo, hace pensar en una mejoría de los datos a medida que las técnicas en su conjunto se normalice. Diferentes autores obtienen mejores resultados en otras razas (Hidalgo *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2009) aunque precisamente la situación genética de cada unas de las poblaciones influye poderosamente en los resultados.

5) Disminución del número de espermatozoides por dosis seminal. Múltiples equipos están trabajando en mejorar la eficacia de cada dosis seminal aplicada y en este punto se han conseguido muchos avances. Las tendencias de la técnica consisten en mejorar la profundidad del lugar uterino donde se depositan los espermatozoides. En el ganado bovino se comenzó colocando la dosis seminal descongelada en el útero en las inmediaciones de la parte craneal del cerviz, y en este caso se utilizaron entre cuarenta a cincuenta millones de espermatozoides por dosis (Hammond *et al.*, 1983; Gordon, 2006). En la actualidad (Kurykin *et al.*, 2003; Gordon, 2006; Vázquez, 2010), la dosis seminal es colocada en las proximidades de la unión uterotubárica; con lo que la dosis seminal ha disminuido el número de espermatozoides entre los seis a diez millones. En el caso de los pequeños rumiantes hay diferencias sustanciales en los espermatozoides contenidos en la dosis seminal, según se deposite en el cerviz o se realice una intervención laparoscópica, siendo de cuatrocientos millones de espermatozoides para la inseminación intracervical (variable según raza o especie) (Parraguez *et al.*, 2000; Gordon, 2006) o de solamente unos ciento de miles cuando se trata de la inseminación intratubárica. En el ganado porcino también se ha avanzado mucho en este aspecto (Gordon, 2006; Vázquez, J.M., 2010) siendo los verracos muy selectos mejor utilizados en mayor número de hembras, habiendo disminuido drásticamente el número de espermatozoides de las dosis frescas, pasando desde los dos mil quinientos millones de espermatozoides hasta solamente ochocientos millones con la aplicación de las nuevas sondas de deposición uterina profunda o postcervical (Arantxa, 2003). Desde este punto de vista la tecnología que menor número de espermatozoides aplica es la inyección intracitoplasmática (ICSI) donde en teoría nos basta con colocar un solo espermatozoide en el espacio perivitelino del ovocito.

6) Sexaje de espermatozoides. Desde hace muchos años se viene demandando la posibilidad de elegir el sexo de los recién nacidos por motivos económicos. Unas veces se requerirán machos por su mejor velocidad de

crecimiento y otros el sexo estará destinado a reposición de reproductores. Varias técnicas (Maxwell *et al.*, 2004; Seidel, 2007; Garner y Seidel, 2008; Vázquez, 2010) se han puesto a punto como las basadas en el diferente gradiente de densidad, o las que afectan a los espermatozoides portadores del cromosoma X o el Y, haciendo más eficaz al primero y disminuyendo la del segundo; aunque en definitiva la más importante es la que se basa en la separación de espermatozoides teñidos con un fluorocromo (Hoechst 33345) y detectados por la tecnología láser con la intervención de un citómetro de flujo laminar (Parilla *et al.*, 2003, 2004). Parece que la eficacia de estas tecnologías todavía no ha llegado a sus cuotas más altas.

7) Micromanipulación de gametos. A finales de la década de los años ochenta del siglo pasado se comenzó la micromanipulación de gametos y embriones para la consecución de varios objetivos reproductivos. Esta técnica es realizada normalmente con la ayuda de microscopía óptica a la que se aplica aparatos de micromanipulación que pueden avanzar en las proximidades del objeto o gameto con una precisión micrométrica. Con las pipetas micromanipuladoras de que consta se puede transportar, sujetar, incidir e inyectar los gametos o embriones, dando lugar a muy diversos resultados: utilización de un solo espermatozoide por ovocito, separar blastómeras, remover el ADN del ovocito, transferir el ADN desde otra célula, transferir insertos de ADN y un largo etc, que todavía está siendo puesto a punto, como la inyección intracitoplasmática de células desecadas. Una somera descripción de lo realizado en este campo es:

- Inyección intracitoplasmática: consiste en la colocación mediante pipetas micromanipuladoras de un solo espermatozoide dentro del espacio perivitelino del ovocito madurado. Esta técnica es muy utilizada en humanos y es de gran acogida en las especies en peligro de extinción donde el almacenamiento de grandes cantidades de dosis seminales encarece la conservación. De esta forma, la utilización de muy pocos espermatozoides cuando se desee reconstituir la raza nos ahorrará espacio y disminuirá costes.

- Clonación: Existen dos situaciones de partida diferentes para la realización de la técnica de clonación:

- a) ADN de los clones producidos idénticos entre ellos pero diferente de los progenitores. En este caso se parte de un embrión que tenga entre ocho y dieciséis blastómeras o a partir de la masa celular interna del embrión en fase de blastocisto. Previamente se han acondicionado varias zonas pelúcidas vacías donde se van a colocar una o varias blastómeras procedentes del embrión, su cultivo y transferencia a una receptora de la especie podrá producir descendientes con el ADN idéntico entre ellos pero diferente a los progenitores del embrión.

- b) ADN de los clones producidos idéntico entre sí y con el progenitor. En este caso es necesaria la realización de microcirugía para retirar el ADN haploide de un ovocito y realizar una transferencia nuclear desde una célula que ha sido sometida a un periodo de quiescencia, siendo preferible que esa célula esté indiferenciada.

Todos estos procesos están siendo acompañados de tecnología que impulse los procesos fisicoquímicos propios a la división celular, como los impulsos seriados de voltajes que pongan en marcha el metabolismo del desarrollo y división celular. Estas técnicas, dado su alto coste, no han sido muy utilizadas en la reconstrucción de razas en peligro de extinción, pero si que están levantando grandes expectativas. Además necesitan de mayores avances para solucionar los problemas derivados de la edad del individuo donante del núcleo a transferir (Vázquez, 2010).

- Obtención de animales transgénicos: Esta es otra de las técnicas que se están utilizando abundantemente en producción de animales con características diferentes a las propias de su especie o raza. Aparte del proceso de micromanipulación de ovocitos y espermatozoides, requieren de técnicas de aislamiento del gen que queremos transponer, hacer que se inserte en el genoma espermático e inyectar este espermatozoide en el espacio perivitelino del ovocito. El proceso posterior de maduración del embrión y/o su transferencia a una receptora hará que se complete la obtención de un animal genéticamente diferente a lo que se esperaba de su genoma, pero produciendo algo necesario a la resolución de enfermedades o a la alimentación especializada (Vázquez, 2010).

- Otros de los procedimientos de la tecnología reproductiva y que se podrán aplicar a la conservación son las novedosas técnicas de deshidratación, desecación y liofilización de los gametos. En especial el gameto masculino liofilizado ya ha proporcionado una tecnología exitosa cuando se combina con la inyección intracitoplasmática. En el caso de espermatozoides liofilizados serán utilizados para la obtención de potros y terneros configurando una gran esperanza en la sustitución del nitrógeno líquido como medio de conservación, evitando además los problemas de transmisión de enfermedades que puede aparecer en los bancos de germoplasma a través del líquido conservante (Choy *et al.*, 2011).

La alta consanguinidad que presentan las poblaciones animales en peligro de extinción hace que muchas de estas técnicas no den los resultados deseados que sí proporcionan en las poblaciones no consanguíneas de los animales comerciales. Es bien conocido que la aparición de genes deletéreos en homocigosis dará como resultado efectos indeseados y, sobre todo va a hacer necesario un nuevo planteamiento de las necesidades de

dosis seminales, ovocitos o embriones en el banco de germoplasma. En nuestro equipo hemos encontrado con frecuencia una disminución de la fertilidad traducido por la aparición de ciclos reproductivos anormales, 30 a 35 días, indicativos de reabsorción embrionaria. También, en ganado bovino hemos detectado el nacimiento de terneros muy débiles que mueren a los pocos días sin una causa aparente. En la especie porcina aparecen defectos de crecimiento en una misma camada, donde varios lechones quedan muy atrasados, por falta de asimilación de los alimentos, mientras que sus hermanos se desarrollan normalmente (Peinado *et al.*, 2013).

Además en el ganado porcino se aprecian en algún caso la aparición de órganos que no son comunes a la raza, como es el caso de las mamellas, pero no están colocados en el lugar donde normalmente le corresponde, como es el cuello, sino en la parte externa del pabellón auricular.

En aves han sido detectadas malformaciones de cadera, displasias y disposición anormal de las vías respiratorias altas y el pico. También se ha acompañado de retrasos en el crecimiento de los pollitos frente a hermanos que se desarrollan normalmente. Finalmente, es necesario comentar la imposibilidad de recuperar una raza en punto crítico de extinción si no se aplican técnicas genéticas de retrocruzamiento (Barba *et al.*, 2000; Peinado *et al.*, 2002; Poto *et al.*, 2002; Almela *et al.*, 2011) utilizando animales de otra raza para que después de varias generaciones se vuelvan a considerar animales propios de la raza en punto crítico. Esto último debe de ser realizado por personal especializado, dado que el intento de los criadores por eliminar la consanguinidad con otras razas puede desembocar en poblaciones diferentes que para nada se parecen lo que se pretende recuperar.



Figura 1. Mamellas en pabellón auricular (*Mamellas in external ear*)

Bibliografía

- Almela, L., Poto, A., Galián, S., Ruiz, S., Romero, J., Peinado, B. 2011. Murcia se esfuerza por la supervivencia de su raza bovina autóctona. *Albéitar*. Publicación para veterinarios y técnicos del sector de animales de producción. Nº 143, pp. 18-20.
- Amantea. 1914. Citado por Félix Pérez y Pérez. 1966. *Reproducción e Inseminación artificial ganadera*. Editorial Científico-Médica. 614 páginas
- Antonie Van Leeuwenhoek. 1677. Citado por Juan María Vázquez Rojas. 2010. *Horizontes en Biotecnología de la Reproducción Animal*. Academia de Ciencias de la Región de Murcia 2010. I.S.B.N.: 978-84-613-7395-6.
- Arantxa E. 2003. Análisis de las nuevas técnicas y avances en la inseminación artificial porcina. XI Congreso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos. Dpto técnico Magapor.
- Astiz S., Romero-Aguirregomez J., Poto A., Ruiz S. 2012a. Producción de embriones in Vitro en el bovino: descripción de la técnica y ejemplos de su aplicación, *Frisona Española*. Marzo/Abril 2012. Nº 188, 88-92.
- Astiz S., Romero-Aguirregomez J., Poto A., Almela L., Peinado B., Ruiz S. 2012b. Primera ternera Murciano-Levantina nacida, obtenida por biotecnologías reproductivas (OPU, fecundación in Vitro, cultivo in Vitro y vitrificación). *Boletín de ANEMBE*, Nº 98, 19-20.
- Barba, C., Camacho, E., Peinado, B., Caballero, A., Delgado, J.V. 2000. Programas de conservación in situ en España. *Porci*. Tratado de ganado porcino. Conservación genética de razas autóctonas. Nº 60, pp. 37-46.

- Brass, K. 2001. Inseminación artificial en la especie equina. Capítulo XXV. En: Palma, G.A. Biotecnología de la Reproducción. Ediciones. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. pp. 525-558. I.S.B.N.: 987-43-3779-6.
- Choi, Y. H., Varner, D. D., Love, C. C., Hartman, D. L. and Hinrichs, K. 2011. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction research. Society for Reproduction and Fertility*. www.reproduction-online.org.
- Chung, J. 1997. Effects of sperm treatments on fertilization and *in vitro* development of bovine follicular oocytes. *Korean J. Embr Trans.* Vol 12 (2). 189-194.
- Dubois. Citado por Félix Pérez y Pérez. 1966. Reproducción e Inseminación artificial ganadera. Editorial Científico-Médica. 614 páginas.
- Duchi, N., Almela, L., Peinado, B., Poto, A. 2008. Estudio preliminar: entrenamiento y valoración de la calidad de semen del palomo Deportivo Murciano. Tipo de participación: póster. VI Congreso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animales. Lisboa.
- Duchi, N., Almela, L., Peinado, B., Poto, A. 2008. Criopreservación de semen de gallo: una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza Murciana. VIII Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE). Bullas, Murcia.
- Duchi, N., Almela, L., Peinado, B., Poto, A. 2009. Extracción y valoración de la calidad de semen del palomo Deportivo Murciano (*Columba livia*). *Archivos de Zootecnia*. Vol. 58. Supl. 1. pp. 537-540.
- Duchi, N. 2009. Calidad del semen, criopreservación y utilidad de la inseminación artificial en el palomo Deportivo Murciano (*Columba livia*). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Murcia. Julio 2009.
- Evans, G, Maxwell, W.M.C. 1989. Manejo y valoración del semen. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Ed. Acribia. pp. 95-107.
- Fiser P.S.; Fairfull R.W. 1990. Combined effects of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws *Mol Reprod. Dev.* 25, 123-129.
- Fiser P.S., Fairfull R.W., Hansen C., Panich P.L., Sherestha J.N.B., Underhill L. 1993 The effect of warning velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glicerol level. *Mole. Reprod. Develop.* 43, 190-195.
- Garner, D.L., Seidel, Jr, G.E. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, 69: 886-895.
- Galina, C., Valencia, J. 2006. Colección del semen bovino. *Reproducción de Animales Domésticos*. 2ed Limusa, Noeniega editors. México D.F. pp. 217-219.
- Garde, J. 1992. Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Gardón, J.C. 1999. Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo embrionario, obtenidos por fertilización *in Vitro*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- Gómez E, Muñoz M, Rodríguez A, Caamaño JN, Facal N, Díez C. Vitrification of bovine blastocysts produced *in vitro* inflicts selective damage to the inner cell mass. *Reprod Dom Anim.* 44: 194-99. 2009.
- Gordon, I. 2006. Tecnología de la reproducción de los animales de granja. Ed. Acribia, S.A. I.S.B.N. 13: 978-84-200-1073-1.
- Hammond, J.Jr, Bowman, J.C., Robinson, T.J. 1983. *Hammond's Farm Animals*, 5th edn. Edward Arnold, London, 305 pp.
- Hancock, J.L. & Howell, G.J.R. 1959. The collection of boar semen. *Vet. Rec.* 71, 664.
- Hidalgo, C.O., Fernández, I., Duque, P., Facal, N., Díaz, E., Prendes, J.M., Menéndez, J., Gómez, E., Prieto, L., Díez, C. 2002. Primeros terneros producidos *in Vitro* tras punción ecoguiada de folículos ováricos. *Arch. Zootec.* 51: 411-422.
- Huygens, Hartsoeker. 1680 – 1695. Citado por Juan María Vázquez Rojas. 2010. Horizontes en Biotecnología de la Reproducción Animal. Academia de Ciencias de la Región de Murcia 2010. I.S.B.N.: 978-84-613-7395-6.
- Ivanoff El. 1922. On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *The Journal of Agricultural Science*, 12 (03), 244-256.
- Kurykin, J., Jaakma, U., Majas, L., Jalakas, M., Aidnik, M., Waldmann, A., Padrik, P. 2003. Fixed time deep intracornual insemination of heifers at synchronized estrus. *Theriogenology*, 60, 1261-1268.

- Martín, S., Lapuente, S., García, J.A., Gil, J. 1994. La inseminación artificial porcina en España. Situación actual y última tecnología. Mundo Ganadero, nº 9, pp. 46-54.
- Maxwell WMC. & Johnson L.A. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. Theriogenology. 48, 209- 219.
- Maxwell, WMC, Evans, G., Hollinshead, F.K., Bathgate, R., de Graaf, S.P., Eriksson, B.M., Gillan, L., Morton, K.M., O'Brien, J.K. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. Anim. Reprod. Sci. 82/83: 79-95
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Anim. J. Physio. 247, C125- C142.
- Mazur P. 1997. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology, 14, 251- 272.
- Miró, J., Ocaña, M. 2006. El análisis seminal. Importancia, posibilidades y su relación con la fertilidad. Equinus, Nº 16, pp. 55-68
- Oropeza, A., Wrenzycki C., Herrmann D., Hadelér K.G., Niemann, H. 2004. Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian IGF-I application. BOR Papers in Press. Published on February 6, 2004 as DOI:10.1095/biolreprod.103.025494.
- Parraguez, V.H., Blank, O., Muñoz, C., Latorre, E. 2000. Inseminación artificial en ovinos. Monografías de Medicina Veterinaria. Vol. 20, Nº 2
- Parrilla, I., Vázquez, J.M., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Yelamos, J., Roca, J., Martínez, E.A. 2003. Fluorescence In Situ Hybridization in diluted and flow cytometrically sorted boar spermatozoa using specific DNA direct probes labelled by Nick Translation. Reproduction, 126: 317-325.
- Parrilla, I., Vázquez, J.M., Caballero, I., Gil, M.A., Hernández, M., Roca, J., Lucas, X., Martínez, E.A. 2004. Hoechst 33342 stain and UV laser exposure do not induce genotoxic effect in flow-sorted boar spermatozoa. Reproduction, 128: 615-621.
- Polge C., Salomo S., Wilmunt I. 1949. Revival of spermatozoa after vitrificación and dehydration at low temperatures. Nature, 164, 666.
- Polge C., Salomo S., Wilmunt I. 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. Vet. Rec. 87, 424- 428.
- Peinado, B., Vega-Pla, A., Martínez, A., Delgado, J. V., Poto, A. 2002. Aspectos genéticos para la recuperación del cerdo Chato Murciano. Albéitar. Nº 61, pp. 18-21.
- Peinado B., Almela L., Poto A. 2012. Situación genética actual de la raza bovina Murciano – Levantina. VIII Congreso ibérico sobre recursos genéticos animales (SPREGA). Évora (Portugal).
- Poto A.; Lobera J.B.; Peinado B. 2000. Razas autóctonas de Murcia. Estimación de censos y aptitudes. Arch. De Zootecnia. Vol.: 49, 107- 114.
- Poto, A., Peinado, B., Marín, M. 2002. El cerdo Chato Murciano. Ediporc, Nº 54, pp. 7-17.
- Poto, A., Duchí, N., Galián, M., Alcaraz, F., Almela, L., Peinado, B. 2007a. Entrenamiento del gallo Murciano a la recogida de semen mediante masaje dorsal. Estudio de la calidad seminal. I Congreso Nacional de Zootecnia. Tipo participación: póster. Madrid.
- Poto, A., Almela, L., Duchí, N., Alcaraz, F., Galián, M., Peinado, B. 2007b. Estudios preliminares en la crioconservación espermática del gallo de raza Murciana. I Congreso Nacional de Zootecnia. Tipo participación: póster. Madrid.
- Reyes-Moreno, C., Gagnon, A., Sullivan, R., Sirard, M. 2000. Addition of specific metabolites to bovine epididymal cell culture medium enhances survival and motility of cryopreserved sperm. J. Androl. 21(6). pp. 876-886.
- Reyes-Moreno, C., Boilard, M., Sullivan, R., Sirard, M. 2002. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during *in vitro* storage. Biol. Reprod. 66 (1). pp. 159-166.
- Roemmele.1932. Citado por Félix Pérez y Pérez. 1966. Reproducción e Inseminación artificial ganadera. Editorial Científico-Médica. 614 páginas.
- Romero-Aguirregomez J., Astiz S., Poto A., Almela L., Peinado B., Ruiz S. 2013. Primera ternera Murciano-Levantina obtenida por biotecnología reproductiva (OPU, fecundación in Vitro, cultivo in Vitro y vitrificación de embriones). XVIII Congreso Internacional Anembe de Medicina Bovina. Lérida.
- Ruiz S., Romero-Aguirregomez J., Astiz S., Peinado B., Almela L., Poto A.2013a. Application of reproductive biotechnology for the recovery of animal endangered breeds: birth of the first calf of bovine breed Murciano-Levantina derived by OPU, in Vitro production and embryo vitrification. Reproduction in Domestic Animals. Volumen: en prensa.

- Ruiz S., Romero-Aguirregomezcorta J., Astiz S., Peinado B., Almela L., Poto A. 2013b. Birth of the first calf of Murciana-Levantina bovine breed derived by OPU, in Vitro production and embryo vitrification. 29th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE). Estambul (Turquía).
- Seidel, Jr, G.E. 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology*, 68: 443-446.
- Spallanzani Lazzaro. 1776. Citado por Juan María Vázquez Rojas. 2010. Horizontes en Biotecnología de la Reproducción Animal. Academia de Ciencias de la Región de Murcia 2010. I.S.B.N.: 978-84-613-7395-6.
- Thilmant P. 1997. Congélation du Speme de Verrat en Paillette de 0.5 ml. Résultats ur le Terrain. *Ann. Méd. Vét.*, 141, 457-462.
- Thilmant P. 1998. Cryopreservation of boar semen in 0.5 ml french straws: field results. 10th Meeting European A.I. Vets. Bruges. 28- 30 october.
- Vázquez, J.M., Roca, J., Gil, M.A., Cuello, C., Vázquez, J.L., Martínez, E.A. 2008. Low-Dose insemination in pigs: problems and possibilities. *Reprod. Dom. Anim.*, 43(Suppl, 2): 347-354.
- Vázquez, J.M. 2010. Horizontes en biotecnología de la reproducción animal. Academia de Ciencias Veterinarias de la Región de Murcia. I.S.B.N.: 978-84-613-7395-6.