

Revisión sistemática de los factores asociados a la presentación de gotas citoplásmicas en porcinos

Systematic Review of Factors Associated with the Presence of Cytoplasmic Droplets in Boars

Germán Gómez¹, Consuelo Velez², Alejandro Ceballos¹ y Francisco J. Henao¹

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Producción Agropecuaria. Universidad de Caldas. Manizales, Colombia. germgolo@ucaldas.edu.co; alejandro.ceballos@ucaldas.edu.co; fhenao@ucaldas.edu.co

² Facultad de Ciencias para la Salud. Departamento de Salud Pública. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. E-mail: consuelo.velez@ucaldas.edu.co

Recibido 25 Febrero 2014//Enviado para Modificación 22 Abril 2014/Aprobado 12 Junio 2014

RESUMEN

Objetivo Determinar los factores asociados con la presentación de gotas citoplasmáticas en porcino.

Métodos Se realizó una revisión sistemática donde se encontraron 133 artículos, se eliminaron 70 por duplicados y 65 se seleccionaron finalmente: 57 en CabAbstract, 39 en Pub Med, 20 en Agrícola y 17 en ScienceDirect. Se recuperaron 47 artículos en texto completo. Los datos se tabularon en EpiDataEntry, se transfirieron al programa Stata versión 12.0.

Resultados Los factores más frecuentemente asociados con la presentación de gotas citoplásmicas en porcinos, son los climáticos (estacionalidad, temperatura ambiental y fotoperiodo) y la frecuencia de eyaculación de los verracos. La información a pesar de ser heterogénea y diversa, no menciona estudios realizados bajo condiciones intertropicales, ni bajo condiciones comerciales, ni involucra animales dedicados a la producción intensiva de semen para reproducción controlada.

Conclusiones La información se caracteriza por su amplia heterogeneidad y diversidad de estudios. Se realiza un aporte a la Salud Pública Veterinaria colombiana sobre la importancia de las GCs como limitantes de los procesos reproductivos en porcinos. No fue posible la determinación de la relación temporal entre la causa y el efecto de las GCs.

Palabras Clave: Espermatozoides, factores epidemiológicos, inseminación artificial, revisión sistemática (*fuentes: DeCS, BIREME*).

ABSTRACT

Objective To determine the factors associated with the presence of cytoplasmic droplets in boars.

Methods A systematic review was carried out in which 133 articles were found, 70 were eliminated due to duplication, and 65 were finally selected: 57 in Cab Abstract, 39 in Pub Med, 20 in Agricola, and 17 in Science Direct. Forty-seven articles were found with an available full text. Data was tabulated in EpiData Entry and transferred to the Stata version 12.0 program.

Results Factors Associated with cytoplasmic droplets are: Climatic and environmental variables; ejaculation frequency with intervals of less than three weeks; spermatic morphologic alterations in tail (coiled and distal reflex); DNA fragmentation; and enzymatic factors related to seminal biochemistry. Work carried out in equatorial climate regions or that focused on the analysis of the implications of CDs in artificial insemination centers was not found.

Conclusions The information is characterized by a wide heterogeneity and diversity studies. A contribution was made to Veterinary Public Health in Colombia on the importance of CGs as factors that limit reproductive processes in swine. It was not possible to determine the temporal relationship between the cause and effect of CDs.

Key Words: Spermatozoa, epidemiologic factors, insemination, artificial systematic review (source: MeSH, NLM).

Las gotas citoplásmicas (GCs) son la alteración espermiática más frecuente encontrada en semen de machos porcinos destinados a procesos de reproducción controlada (1,2). El hallazgo de una elevada proporción de estas en los eyaculados está claramente correlacionada con bajos niveles de fertilidad de los reproductores; así mismo, se ha identificado variabilidad en la frecuencia de presentación de GCs entre machos a lo largo de su vida (2,3). Las GCs son vesículas residuales del citoplasma, de 2 μm de diámetro (4), proximales o distales, según su ubicación en la pieza intermedia (5-7), que en condiciones normales son eliminadas, en alta proporción, en el epidídimo, antes, (8) durante (9) o inmediatamente después de la eyaculación (10). Se considera que un macho tiene persistencia de GCs cuando presenta un porcentaje \geq al 20 % (11,12).

En el control de la calidad seminal de porcinos, hasta ahora solo se han realizado aproximaciones al diagnóstico objetivo de las GCs y su relación con la fertilidad (9,13,14), lo cual hace necesario el contar con información que permita identificar en la literatura, los factores asociados a la presentación de GCs. El objetivo del presente trabajo fue aportar antecedentes, mediante la realización de una revisión sistemática, acerca de la evidencia que se encuentra publicada con respecto a la presencia de las gotas citoplasmáticas y su eventual asociación con los factores de

riesgo, orientada, con especificidad, a clima (estacionalidad, temperatura, humedad relativa y fotoperiodo), edad del verraco, morfología espermática, sanidad del verraco, alimentación del verraco, y frecuencia de eyaculación. La identificación de los factores de riesgo asociados a las presentación de GCs son un aporte relevante en el campo de la salud pública veterinaria, debido a sus posibles implicaciones en el proceso productivo dado que su control, de manera indirecta, mejora las condiciones relacionadas con el medio ambiente (temperatura y humedad), alimentación y condiciones sanitarias, factores claves en la salud pública animal.

METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda de literatura en bases de datos electrónicas para identificar estudios primarios realizados entre 1975 y 2012. Se consultaron las siguientes bases de datos, disponibles en la biblioteca de la Universidad de Caldas: CAB ABSTRACTS (vía internet), PUB MED (vía internet), AGRICOLA (vía internet), y SCIENCE DIRECT (vía internet). Los términos utilizados inicialmente para las búsquedas fueron: (boar OR cerdo) AND (espermatozoides OR spermatozoa OR semen OR gota citoplasmática OR cytoplasmicdroplet) AND (fecundación OR fertilization) AND (factores de riesgo OR risk factor). Se restringieron las revistas y las publicaciones elegibles a aquéllas publicadas en bases de datos, no se incluyeron resúmenes o actas de congresos, capítulos de libros y tesis de grado. Para incluir el artículo en la revisión, se tuvo en cuenta que fuera fruto de investigación primaria, que fuera publicada en revista indexada y que en el título o en el resumen se incluyera alguna de las palabras usadas en la búsqueda.

El evento de interés para la realización de la revisión sistemática fue el reporte de la presencia de GCs en machos porcinos reproductivamente activos y la indicación de su eventual asociación con algunos factores de riesgo. Los artículos seleccionados presentaron información pertinente sobre GCs en el título o en el resumen con el obtener la información relacionada con la calidad del estudio y la presencia de GCs.

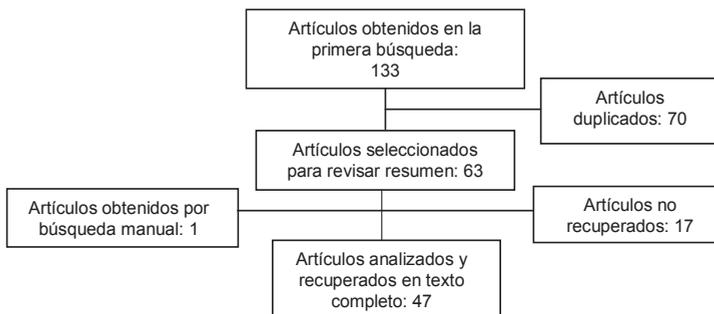
A continuación se procedió con la consecución del manuscrito completo para hacer la extracción de la información, la cual se obtuvo separadamente por dos personas, uno de los autores y otra persona ajena a los mismos, la cual se consignó en dos bases de datos, estas se compararon, con el objeto de validar la extracción inicial de la información; las inconsistencias

fueron resueltas por el autor senior de la revisión. Una vez obtenida la lista de referencias de cada base de datos, fue exportada al programa EndNote versión X7 (Thomson Reuters, New York, NY, USA) para la eliminación de los duplicados y la revisión y el procesamiento de las citas bibliográficas. Posteriormente, los datos correspondientes a la evaluación de la calidad del estudio se tabularon usando el programa EpiData versión 3.1 (EpiDataAssoc., Odense, Denmark) y fueron transferidos a una tabla en el programa Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) para el análisis y tabulación de la información.

Al realizar la búsqueda con los términos mencionados, no se encontraron resultados o referencias asociadas con los mismos, lo que indicó una alta restricción con la combinación de términos utilizada; por lo tanto, se rediseñó la estrategia final de búsqueda mediante la utilización de las siguientes palabras clave y conectores booleanos: (cytoplasmicdroplet) AND (boar), limitando la búsqueda a artículos de texto completo que contuviera las palabras clave, bien fuera en el título o en el resumen, y sin restringir la fecha de publicación.

Como se puede apreciar en la Figura 1, con las modificaciones introducidas en la combinación de términos para la búsqueda, se encontraron 133 referencias, de las cuales se obtuvieron 57 referencias en el CAB ABSTRACTS, 39 en PUB MED, 20 en AGRICOLA y 17 en SCIENCE DIRECT, se eliminaron 70 referencias que estaban citadas en dos o más bases de datos, quedando finalmente 65 estudios originales.

Figura 1. Flujoograma de las 133 citas encontradas y los 47 estudios seleccionados



Posterior al análisis de la publicación, se procedió a realizar la revisión general del resumen, con el fin de confirmar la pertinencia del estudio y la

viabilidad de ser incluido en la revisión; a continuación se seleccionaron y recuperaron en texto completo 47 publicaciones, los cuales se imprimieron en su totalidad para proceder a realizar la extracción de datos y su posterior análisis.

RESULTADOS

La revisión sistemática mostró que la mayor parte de los artículos se publican en idioma inglés, en los países de Estados Unidos, España, Japón, Inglaterra y Alemania. En cuanto al año de realización del estudio, de los 47 trabajos realizados, siete se publicaron en la década de los 70, diez en los 80, tres en los 90 y entre el 2000-2010 se publicaron 14 estudios relacionados con el resultado de interés.

En la Tabla 1 se presentan los factores asociados con la ocurrencia de GCs en machos porcinos activos reproductivamente. Los factores más reportados sobre la ocurrencia de las GCs están relacionados con el clima, la elevada temperatura ambiental, la presencia de lipooxigenasa, la frecuencia de eyacuación, la capacidad de adhesión en epidídimo, la fragmentación de ADN. Adicional a estos, se han estudiado otros factores como la morfología del espermatozoide, temperatura escrotal, edad de los verracos, y temperatura del semen entre otras.

Tabla 1. Factores asociados a la presentación de gotas citoplásmicas en porcinos, identificados en la literatura

Factores	Referencia
Asociados con clima	
Clima (estación, primavera, verano), fotoperiodo	(15-18)
Temperatura ambiental alta	(7,16,19)
Asociados con el macho	
Edad del verraco	(20)
Frecuencia eyacuación	(10,18)
Alta Temperatura escrotal	(21)
Asociados con manipulación del semen	
Tiempo de almacenamiento del semen	(22)
Temperatura del semen	(22)
Asociados con calidad seminal	
Fragmentación de DNA y cromatina inestable.	(23,24)
Cola corta	(25)
Cola enrollada	(26)
Reflejo distal	(14)
Plasma seminal	(27,29)
pH	(29)
Bioquímicos	
Capacidad de adhesión en epidídimo	(30,31)
Heprinbinding	(32)
15 Lipooxigenasa	(9,13,33)
Pseudorabia	(34)

En la Tabla 2 se describen los factores asociados a la presentación de GCs con sus respectivos niveles críticos asociados al efecto. El clima está relacionado de manera frecuente con la presentación de GCs, a niveles de temperatura ambiental mayores de 31,6°C, a humedad relativa mayor a 78%; seguido por la frecuencia de eyaculación (recolecciones superiores a 2 eyaculados por semana) y la disminución de GCs por el suministro de selenio en la dieta

Tabla 2. Factores asociados y niveles críticos de afectación sobre la presentación de gotas citoplasmáticas en machos porcinos activos reproductivamente

Factor	Nivel de la afectación	Relación de la asociación	Autor
Temperatura y humedad ambiental	31,6 - 40,0°C 78 % - 96 % humedad relativa. Incremento de GCs por alta temperatura ambiental y humedad relativa, Verano	Incremento de GCs	(15-18,35)
Clima (estación, primavera, verano)			
Fotoperiodo	Baja luminosidad en otoño.	Incremento en la presentación GCs	(36)
Edad	Tendencia a mayor presentación de GCs en verracos adultos	Incremento en la presencia de GCs con la edad	(20)
Frecuencia eyaculación	Más de 2 eyaculaciones por semanas	Incremento en la presentación GC	(10,18,37)
Tiempo de almacenamiento y temperatura del semen	Disminución de gotas a 15°C y 48 horas	Disminución de GCs en semen procesado	(22)
Suministro de Testosterona	Inyección de 250 - 500 mg	Disminución en la incidencia de las GCs	(17)
Temperatura escrotal alta	Temperatura escrotal superior a los 39°C	Incremento de GCs en eyaculado	(21)
Suministro de Selenio en dieta	0.5 ppm en alimento	Disminución de las GCs	(16,38)
Fragmentación de DNA	Espermatozoides con índice >15 %	Asociado a GCs proximales.	(23)
Cromatina inestable	Espermatozoides con cromatina inestable >5 %	Asociada a GCs	(24)
Cola corta	Defecto genético en semen	Presencia de GCs	(39)
Cola enrollada Pseudorabia	Asociada a gota Infección experimental	Asociada a gota Incremento en la presentación de GCs	(34)

DISCUSIÓN

Se considera a las GCs como la malformación seminal más frecuentemente asociada con eyaculados de baja calidad y con bajos niveles de fertilidad

en los machos afectados, así mismo se reporta como la anomalía más frecuente en semen de machos porcinos destinados a inseminación artificial (1,2,29,40). Adicionalmente, se ha encontrado una alta variación en la frecuencia de presentación de GCs entre machos, a lo largo de su vida útil, así como y su persistencia en otros (2,3).

De acuerdo con esta revisión, los factores más frecuentemente asociados con la presentación de GCs en porcinos, son los climáticos (estacionalidad, temperatura ambiental y fotoperiodo) y la frecuencia de eyaculación de los verracos.

Respecto a los factores climáticos, en ocho de los estudios incluidos en la revisión se encontraron reportes sobre asociaciones entre la prevalencia de GCs y variables climáticas, de los cuales tres tocan directamente con el incremento de las GCs en el verano, en países con estaciones, como Japón (17,18,35); otros tres hacen referencia a una asociación positiva entre prevalencia de GCs y temperatura ambiental y humedad relativa (7,16,19), en particular Larson y Einarsson (1984) encontraron elevaciones manifiestas en el porcentaje de GCs arriba de 31.6°C y de 78 % de humedad relativa; y los otros dos autores reportan aumento de las GCs asociado a la disminución de las horas luz en el otoño (15,36).

Con relación a la frecuencia de eyaculación, se encontraron reportes donde verracos eyaculados con una frecuencia mayor a dos colectas por semana, presentaron una mayor proporción de GCs, las cuales se consideran como signo de inmadurez espermática (10,41,42).

Con respecto a los estudios analizados, la mayoría son descriptivos, se caracterizan por representar un bajo nivel dentro de la escala de la evidencia científica, pueden estar sujetos a sesgos de selección, no siguen un proceso sistemático y aleatorio para la selección de las muestras, por lo cual no es posible la determinación de la relación temporal entre la causa y el efecto debido al proceso de selección de los casos de machos positivos a GCs. Un ejemplo de esta causación reversa es la asociación entre la presencia de GCs y la actividad enzimática (13,43).

La información analizada se caracteriza por su amplia heterogeneidad y diversidad de estudios, ninguno de los cuales se desarrolló bajo condiciones de explotación comercial o involucrando animales dedicados a la producción intensiva de semen.

Se destaca la falta de estudios relacionados con las implicaciones económicas, productivas y reproductivas de las GC en explotaciones comerciales o en centros de producción comercial de semen.

Las gotas citoplásmicas (GCs) son la alteración espermática más frecuente encontrada en semen de machos porcinos destinados a procesos de reproducción controlada ■

REFERENCIAS

1. Althouse GC. Cytoplasmic droplets on boar sperm cells. *Swine Health and Production*. 1998;6(3):128.
2. Gómez G. Dinámica de la Calidad Seminal en Verracos del centro occidente de Colombia [MsC]. Manizales, Caldas, Colombia: Universidad de Caldas; 2010.
3. Diaz O, Mesa H, Gómez G, Henao FJ. Evaluación invitro de la viabilidad del semen porcino hasta 120 horas de almacenamiento en refrigeración. *Veterinaria y Zootecnia*. 2009;3(1):32-7.
4. Kaplan M, Russell LD, Peterson RN, Martan J. Boar sperm cytoplasmic droplets: their ultrastructure, their numbers in the epididymis and at ejaculation and their removal during isolation of sperm plasma membranes. *Tissue Cell*. 1984;16(3):455-68.
5. Bonet S, Briz M, Fradera A. Ultrastructural Abnormalities of Boar Spermatozoa. *Theriogenology*. 1993; 40:383-96.
6. Bonet S, Briz M, Fradera A, Egozcue J. Origin, development and ultrastructure of boar spermatozoa with folded tails and with two tails. *Hum Reprod*. 1992;7(4):523-8.
7. Larsson K, Einarsson S. Seminal changes in boars after heat stress. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1984;25(1):57-66.
8. Briz MDB, S.; Camps, R. Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. . *Anim Reprod Sci*. 1996;43:221-39.
9. Fischer KA, Van Leyen K, Lovercamp KW, Manandhar G, Sutovsky M, Feng D, et al. 15-Lipoxygenase is a component of the mammalian sperm cytoplasmic droplet. *Reproduction*. 2005;130(2):213-22.
10. Pruneda A, Pinart E, Dolores Briz M, Sancho S, Garcia-Gil N, Badia E, et al. Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. *Theriogenology*. 2005;63(8):2219-32.
11. Bonet S. Immature and aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. *Animal Reproduction Science*. 1990;22:67-80.
12. Bonet S, Briz M, Fradera A. Ultrastructural abnormalities of boar spermatozoa. *Theriogenology*. 1993;40:383-96.
13. Lovercamp KW, Safranski TJ, Fischer KA, Manandhar G, Sutovsky M, Herring W, et al. Arachidonate 15-lipoxygenase and ubiquitin as fertility markers in boars. *Theriogenology*. 2007;67(4):704-18.
14. Lovercamp KW, Safranski TJ, Fischer KA, Manandhar G, Sutovsky M, Herring W, et al. High resolution light microscopic evaluation of boar semen quality sperm cytoplasmic droplet retention in relationship with boar fertility parameters. *Arch Androl*. 2007;53(4):219-33.
15. Andersson H, Wallgren M, Rydhmer L, Lundström K, Andersson K, Forsberg M. Photoperiodic effects on pubertal maturation of spermatogenesis, pituitary responsiveness to exogenous GnRH, and expression of boar taint in crossbred boars. *Anim Reprod Sci*. 1998;54(2):121-37.

16. Echeverría-Alonzo S, Santos-Ricalde R, Centurión-Castro F, Ake-López R, Alfaro-Gamboa M, Rodríguez-Buenfil J. Effects of dietary selenium and vitamin E on semen quality and sperm morphology of young boars during warm and fresh season. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2009;8(11):2311-7.
17. Nakayama H, Hidaka R, Ashizawa K. Effects of testosterone injection on the semen quality in boars during high ambient temperature. *Anim Reprod Sci*. 1991;25(1):73-82.
18. Suriyasomboon A, Lundeheim N, Kunavongkrit A, Einarsson S. Effect of temperature and humidity on sperm morphology in Duroc boars under different housing systems in Thailand. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2005;67(8):777-85.
19. Kuster CE, Hess RA, Althouse GC. Immunofluorescence reveals ubiquitination of retained distal cytoplasmic droplets on ejaculated porcine spermatozoa. *J Androl*. 2004;25(3):340-7.
20. Díaz FO, Mesa H, Valencia Mejía JG, Gómez Londoño G, Henao Uribe FJ. Evaluación de la integridad acrosomal y la funcionalidad bioquímica de la membrana espermática en cerdos reproductores con gotas citoplásmicas persistentes. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia*. 2009;19(5):500-5.
21. Malmgren L. Experimentally induced testicular alterations in boars: sperm morphology changes in mature and peripubertal boars. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 1989;36(6):411-20.
22. Zou CX, Yang ZM. Evaluation on Sperm Quality of Freshly Ejaculated Boar Semen During InVitro Storage Under Different Temperatures. *Theriogenology*. 2000;53:1488, 2000.
23. López-Fernández C, Pérez-Llano B, García-Casado P, Sala R, Gosálbez A, Arroyo F, et al. Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock. *Anim Reprod Sci*. 2008;103(1-2):87-98.
24. Ardón F, Helms D, Sahin E, Bollwein H, Töpfer-Petersen E, Waberski D. Chromatin-unstable boar spermatozoa have little chance of reaching oocytes in vivo. *Reproduction*. Bristol; UK: Bioscientifica Ltd; 2008. p. 461-70.
25. Sukura A, Mäkipää R, Vierula M, Rodríguez-Martínez H, Sundbäck P, Andersson M. Hereditary sterilizing short-tail sperm defect in Finnish Yorkshire boars. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2002;14(5):382-8.
26. Holt WV. Epididymal origin of a coiled-tail sperm defect in a boar. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1982;64(2):485-9.
27. Berger T, Clegg ED. Effect of male accessory gland secretions on sensitivity of porcine sperm acrosomes to cold shock, initiation of motility and loss of cytoplasmic droplets. *J Anim Sci*. 1985;60(5):1295-302.
28. Harayama H, Kato S. Changes in motility and morphology of spermatozoa during their transit through the epididymis in Meishan boars at various ages. *Animal Science and Technology*. 1992;63(5):462-7.
29. Kato S, Shibuka W, Harayama H, Kanna Y. Timming of Shedding and Disintegration of Cytoplasmic Droplets from Boar and Goat Spermatozoa. *Reproduction and Development*. 1996;42(4):237-41.
30. Waberski D, Weitz KF, Töpfer-Petersen E, Petrunkina AM, Magnus F, Ardón F. Binding of boar spermatozoa to oviductal epithelium in vitro in relation to sperm morphology and storage time. *Reproduction : the official journal of the Society for the Study of Fertility*. 2006;131(2):311-8.
31. Yeste M, Castillo-Martín M, Bonet S, Briz MD. Direct binding of boar ejaculate and epididymal spermatozoa to porcine epididymal epithelial cells is also needed to maintain sperm survival in in vitro co-culture. *Anim Reprod Sci*. 2012(0).
32. Sanchez-Prieto J, Lorenzo PL, Orensanz LM, Gonzalez J, Illera MJ. (3H)heparin binding in boar spermatozoa: characterization and correlation with routine semen quality parameters. *Biology of reproduction*. 1996;55(4):860-7.
33. Tamblin TM. Identification of actin in boar epididymal spermatozoa. *Biology of*

- Reproduction. 1980;22(3):727-34.
34. Larsen RE. Studies of semen parameters during pseudorabies infection in the boar. Dissertation Abstracts International. 1980;40B(9):4161-2.
 35. de Serrano GL, Fuentes A, Valle A, Regueiro C. A study of sperm abnormalities in boars in relation to breed and season. Estudio de las anomalías espermáticas de los verracos en relación con raza y época. *Zootecnia Tropical*. 1989;7(1-2):93-117.
 36. Sancho S, Pinart E, Briz M, Garcia-Gil N, Badia E, Bassols J, et al. Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods. *Theriogenology*. 2004;62(7):1271-82.
 37. Suriyasomboon A, Lundeheim N, Kunavongkrit A, Einarsson S. Effect of temperature and humidity on sperm production in Duroc boars under different housing systems in Thailand. *Livestock Production Science*. 2004; 89:19-31.
 38. Marin-Guzman J, Pate JL, Pope WF, Mahan DC, Chung YK. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *J Anim Sci*. 1997;75(11):2994-3003.
 39. Skura A, Mäkiää R, Vierula M, Rodriguez-Martinez H, Sundbäck P, Anderson M. Hereditary sterilizing short-tail sperm defect in Finnish Yorkshire boars. *J Vet Diagn Invest* 2002;14:382-8.
 40. Arestova IY, Alekseev VV. Morphological Analysis of the Sperms of Breeding Boars Maintained on Nutritional Supplements. *Global Veterinaria*. 2013;11(1):84-7.
 41. Bonet S. Estudio del eyaculado de un verraco estresado por la frecuencia de recogidas en inseminación artificial. *Scientia gerundensis*. 1987;13:35-40.
 42. Frangez R, Gider T, Kosec M. Frequency of Boar Ejaculate Collection and its Influence on Semen Quality, Pregnancy Rate and Litter Size. *Acta Vete Brno* 2005;74:265-73.
 43. Lovercamp KW. Arachidonate 15-lipoxygenase and ubiquitin as potential fertility markers in boars [MSc]. Missouri-Columbia: University of Missouri-Columbia; 2004.