

Manual Práctico para profesionales

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL PORCINA



Swine Artificial Insemination
KUBUS S.A.
Inseminación Artificial Porcina

25
años
Experiencia

© 2010 **Kubus**

Polígono Industrial Európolis

C/ Varsovia, 20 - Pol. Industrial Európolis - 28232 Las Rozas (Madrid)

Tel. 91 636 02 68 / Fax 91 637 53 13

e-mail: kubus@kubus-sa.com / www.kubus-sa.com

Depósito legal: M.8929-1999

Diseño y maquetación: **Mainzer Producción Gráfica** / www.mainzerpg.com

Manual de inseminación artificial porcina

Equipo Técnico de KUBUS, S.A.

ÍNDICE

Prólogo a la 3ª edición 6

1. Introducción 13

1.1 Ventajas de la inseminación artificial 13

2. El verraco 13

2.1 Anatomía del aparato genital masculino 13

2.2 Fisiología del aparato genital del verraco 13

2.3 Entrenamiento de los verracos para la inseminación artificial 13

3. Producción de dosis seminales 18

3.1 Laboratorio de I.A.: Equipamiento mínimo necesario y opciones 8

3.2 Mantenimiento y cuidado del material de laboratorio 10

3.3 Recolección de semen 10

3.4 Contrastación de semen 12

3.5 Elaboración de dosis seminales 12

3.6 Características y propiedades del diluyente 12

3.7 Conservación de las dosis seminales 12

3.8 Anexo 12

4. Otras La cerda

4.1 Anatomía del aparato genital femenino 8

4.2 Pubertad 10

4.3 Ciclo sexual 10

4.4 Inducción y control del ciclo estral 12

5. Detección del celo 13
6. Momento más adecuado para la aplicación de dosis 13
7. Aplicación del semen 18
 - 7.1 Laboratorio de I.A.: Equipamiento mínimo necesario y opciones 8
 - 7.2 Mantenimiento y cuidado del material de laboratorio 10
 - 7.3 Recolección de semen 10
 - 7.4 Contrastación de semen 1
8. Uso de plasma seminal sintético en cerdas nulíparas 54
9. Manejo de la cerda inseminada y diagnóstico precoz de gestación 94
10. Control ambiental en el centro de inseminación porcino 94
11. Nutrición del verraco 94
12. Anexos 94
 - 12.1 Protocolo de actividades para centros de inseminación 8
 - 12.2 Fichas 10
 - 12.1 Ficha de control individual de verraco 8
 - 12.2 Ficha de seguimiento de producción de dosis en un C.I.A 10
 - 12.3 Calendario de ritmos de recogida 10
 - 12.3 Calidad de aguas purificadas 10

Prólogo a la tercera edición

Les entregamos la tercera edición del manual dedicado a la reproducción asistida del ganado porcino. Han pasado muchos años desde cuando por vez primera salió de la imprenta el "Manual de inseminación artificial porcina". Este libro, ilustrativo y cómodo para la lectura, ideado por el Dr. Santiago Martín Rillo (1952-2000), se encontró con tanta y entusiasmada acogida que pronto fue traducido al inglés por la Dra. Cristian Glossop y al polaco por el Prof. Dr. Jerzy Strzezek. La segunda edición vio la luz en 1999, un año antes del fallecimiento de su autor, la cual, en el pasado reciente ha servido de modelo para el libro de Dr. Stanimir Dimitrov y col. presentado en el año 2010 a los lectores búlgaros.

El Dr. José Luis García Ferrero, el único veterinario que llegó a presidir el gabinete del titular del Ministerio de Agricultura, en un momento de su "In memoriam" (2001) para ANAPORC se pronuncia de esta manera:

"Sólo su vitalidad y su entrega, han sido capaces de proyectar toda la ciencia posible sobre la producción animal, enriquecida de tal modo, que desde sus acciones todo parece más fácil, en este complicado campo. El mundo de la producción porcina tiene un antes y un después de Santiago Martín Rillo. No hay ganadero, ni profesional del sector, que no haya aprendido de sus enseñanzas, de sus consejos y sus soluciones. La capacidad y la fuerza de Santiago Martín Rillo han roto el marco nacional, para alcanzar una proyección internacional, que no tiene parangón en el campo agrario."

Actualmente están en uso las siguientes técnicas de reproducción asistida de ganado porcino:

- Selección de los futuros reproductores
- Manejo de los verracos para IA
- Selección de las futuras reproductoras
- Educación sexual de la nulípara
- Detección de celo de las nulíparas y cerdas destetadas
- Inseminación
- Manejo de granja en continuo o en bandas a 3 ó 5 semanas.

Para que sea posible mejorar los resultados de una explotación sirviéndose de las ventajas de la IA hace falta formarse y aplicar con todo detalle los protocolos que hablan de:

- Obtención del material
 - Recogida de los eyaculados
 - Recogida de los oocitos mediante laparoscopia o cirugía
 - Recogida de los embriones mediante laparoscopia o cirugía
- Tratamientos biotecnológicos
 - Preparación de las dosis seminales y envasado/encapsulado
 - Refrigeración y conservación de las dosis seminales
 - Congelación y conservación de las dosis seminales
 - Descongelación de las dosis seminales
 - Separación espermática por citometría de flujo
 - Fecundación in vitro de los oocitos
 - Conservación de los embriones
 - Vitricación de los embriones
- Técnicas de inseminación de las cerdas
 - Inseminación artificial estándar
 - IA estándar bifásica
 - IA estándar "manos libres"
 - Inseminación postcervical
 - Inseminación intrauterina profunda
 - Inseminación intraoviductal con laparoscopia
 - Trasplante de los embriones mediante cirugía o sin ella

Los autores del manual que les entregamos han hecho todo lo posible para que el texto sea lo más aproximado al lenguaje del Dr. Santiago Martín Rillo. El Prof. Dr. José Manuel Sánchez Vizcaíno, recordando a su amigo, describe la forma de enseñanza y divulgación de éste como un "intentar llevar los temas de porcicultura de manera divulgativa y actualizada".

Esperamos que este esfuerzo venga a sumarse a la formidable labor profesional de nuestro Patrón y a contribuir en la imparable mejora de la producción porcina. La Fundación "Dr. Santiago Martín Rillo" hace especial hincapié sobre la labor benéfica y libre de cualquier remuneración económica de los autores del libro. Mostramos nuestro agradecimiento a la inmediata respuesta de Prof. Dr. Adam Ziecik (capítulo 4), del Prof. Dr. Antonio Palomo (capítulo 11) y del Prof. Dr. Enric Marco (Capítulo 9).



01

Introducción

Ventajas de la inseminación artificial



Swine Artificial Insemination
KUBUS S.A.
Inseminación Artificial Porcina

Ventajas zootécnicas

- Disminución del número de verracos con ahorro de espacio y de costes de mantenimiento.
- Difusión rápida del progreso genético, mejorando los rendimientos al utilizar sementales de mayor valor genético obteniéndose una mejora más rápida en las explotaciones porcinas.
- Producción de lotes más homogéneos con destino al matadero.
- Incremento en la precisión de la evaluación del valor genético:
- Los sementales en I.A. producen una gran descendencia.
- La información medida en la descendencia e incluida en un índice de selección aumenta la precisión en la evaluación de los caracteres medidos.
- Incremento en la intensidad de selección por aumentar el número de concepciones por semental vía IA en comparación con monta natural, por lo que se reduce el número de sementales a ser seleccionados.
- Permite controlar la calidad espermática de los sementales que están sujetos a múltiples efectos medio ambientales, de manejo y sanitarios.

Ventajas sanitarias

- Reducción del riesgo de transmisión y aparición de enfermedades infecto-contagiosas por vía sexual.
- Se reduce la entrada de animales portadores de enfermedades del exterior.

Ventajas de manejo

- Ahorro de tiempo y esfuerzo evitando la monta natural y el desplazamiento de los reproductores.
- Permite usar animales de distinto peso en el cruce.
- Reduce el stress de animales con problemas cardiacos o de claudicación durante la monta.

02

El verraco

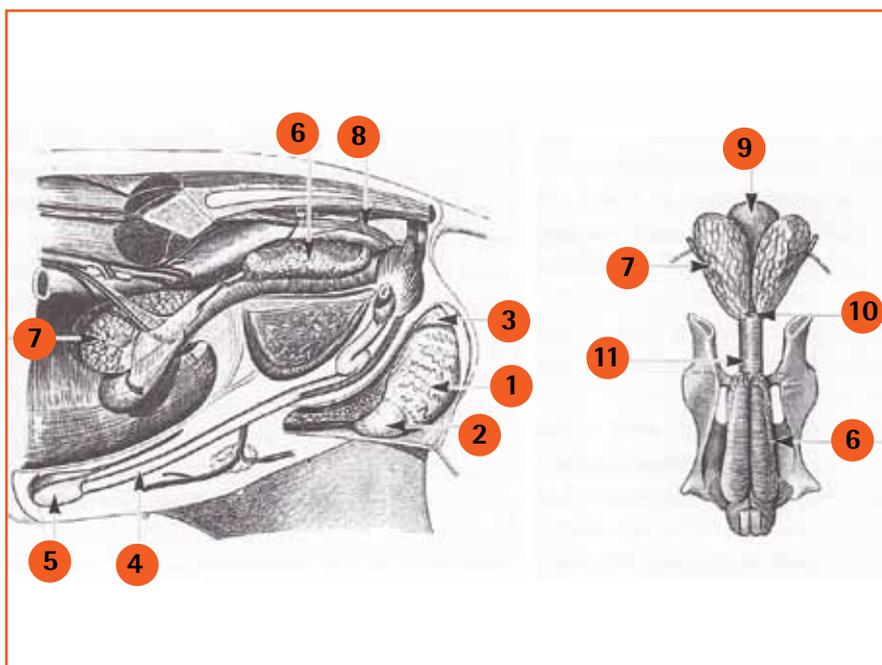
Anatomía y fisiología



Swine Artificial Insemination
KUBUS S.A.
Inseminación Artificial Porcina

2.1 Anatomía del aparato genital masculino

- 1. Testículo.
- 2. Cabeza del epidídimo.
- 3. Cola del epidídimo.
- 4. Pene.
- 5. Divertículo prepucial.
- 6. Glándula bulbouretral.
- 7. Glándula vesicular.
- 8. Músculo retractor del pene.
- 9. Vejiga.
- 10. Próstata.
- 11. Uretra.



2.2 Fisiología del aparato genital del verraco

Las principales hormonas reguladoras del sistema reproductivo del macho son:

- La hormona liberadora de gonadotrofina o gonadorrelina (Gn-RH) producida en el hipotálamo.
- La LH, hormona luteinizante, y la FSH, hormona foliculoestimulante, que se producen en el lóbulo anterior de la hipófisis y están bajo el control de Gn-RH mediante mecanismos de retroalimentación negativa.
- Testosterona, principal esteroide producido por las células de Leydig.

La hormona luteinizante, LH, es la que estimula las células intersticiales, células de Leydig, para que segreguen testosterona.

La hormona foliculoestimulante, FSH, actúa sobre las células de Sertoli. Es la responsable de la estimulación del crecimiento de los túbulos seminíferos y de la espermatogénesis por influir al transporte de los andrógenos: testosterona procedente de los testículos y androstediona sintetizada por glándulas suprarrenales.

La testosterona marca los caracteres anatómicos del macho, controla el comportamiento sexual, espermatogénesis, la actividad de las glándulas sexuales accesorias y el mecanismo de erección.

Se considera que un verraco adquiere la pubertad cuando aparecen espermatozoides libres en los túbulos seminíferos y se inicia su almacenamiento en el epidídimo, es decir, hacia los 4-5 meses de edad. El eyaculado de un verraco comienza a tener unos parámetros de calidad seminal aceptables para su utilización en I.A. hacia los 8 meses de vida y siempre que se hayan obtenido al menos 6-7 eyaculados con anterioridad a la entrada del animal en producción. La calidad seminal, tanto en volumen como en concentración, aumenta hasta la edad de 2-3 años de vida para empezar a descender a partir de los 3-4 años.

Los testículos están formados por un conjunto de túbulos denominados "túbulos seminíferos" que encierran dos tipos de células: germinativas y células de sostén llamadas de Sertoli. El tejido intersticial está formado por tejido conectivo y por las células de Leydig, secretoras de andrógenos.

La espermatogénesis, proceso de desarrollo de una célula germinativa en espermatozoide maduro, en el verraco dura aproximadamente 34 días. A continuación, los espermatozoides pasan a través de la red testicular y conductos eferentes al epidídimo donde, experimentan una maduración final durante un periodo de 14 días.

Las glándulas sexuales accesorias contribuyen con sus secreciones a la incorporación de distintas sustancias que constituirán el plasma seminal. Las vesículas seminales aportan ácido cítrico, inositol, ergotioneína, fructosa-glucosa, potasio, fósforo. La próstata aporta fundamentalmente cloruros y una baja concentración de ácido cítrico. Las glándulas de Cowper o bulbouretrales aportan gran cantidad de sialoproteínas además de calcio, sodio y magnesio. La función de todas estas glándulas está relacionada con la secreción de testosterona por parte del testículo.

Contracciones involuntarias de la musculatura lisa impulsan a los espermatozoides desde la cola del epidídimo y conducto deferente hacia la uretra, siendo las contracciones de esta última las que impulsan al semen en el momento de la eyaculación.

En el momento de la eyaculación el pene se encuentra totalmente extendido, erecto, gracias a su naturaleza fibroelástica. Su tamaño real cambia poco en este acto y la impresión del aumento aparente se debe a la relajación del músculo que regula la curvatura sigmoidea. Esto permite la salida y endurecimiento del pene.

Durante la eyaculación se mezclan casi de manera instantánea en la región de la uretra pelviana una masa densa de espermatozoides con el plasma seminal de las glándulas accesorias para formar el fluido, semen, expulsado desde el pene. El testículo y epidídimo contribuyen con el 5% del eyaculado final mientras que las glándulas accesorias aportan hasta un 95% de su volumen.

2.3 Entrenamiento de los verracos para la inseminación artificial

El entrenamiento de los verracos consiste en hacerlos saltar sobre un potro o maniquí para poder realizar la extracción de semen.

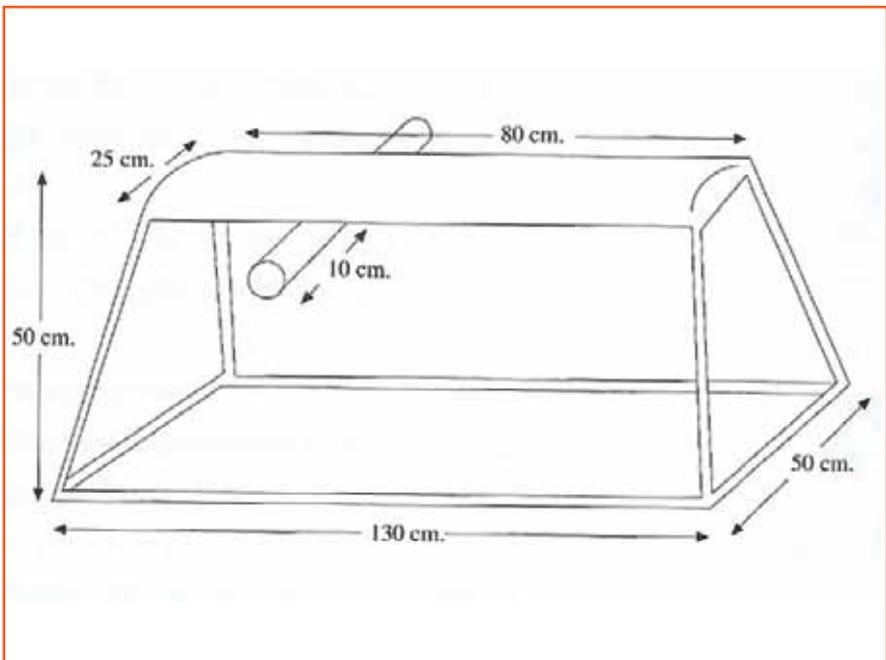
Para proceder, el potro o maniquí ha de ser fácil de transportar y ligeramente más bajo que la altura de los ojos del verraco, por lo que debe tener las medidas aproximadas a una cerda primeriza. Debe ser lo suficientemente cómodo y firme para que el animal no sufra daño y mantenga la estabilidad durante el procedimiento.

Hay que tener en cuenta el comportamiento sexual natural del verraco ante la hembra que de forma general va precedido por olfateos y golpes de hocico en los flancos y parte posterior produciéndose finalmente el salto en la mayoría de los casos.

Un verraco puede comenzar a ser entrenado a partir de los 6 - 7 meses de edad. Los machos adultos que ya han sido utilizados para la monta natural no presentan ningún inconveniente para someterles a entrenamiento, aunque en ciertas ocasiones, con determinados machos, no se logra el objetivo de que salte sobre el potro. Es conveniente que los animales estén alojados individualmente, puesto que si están agrupados resulta más laborioso su aprendizaje.

El entrenamiento se puede realizar con potro móvil o directamente en el potro fijo situado en la sala de recogida de semen, si bien es recomendable empezar con el potro móvil para que los primeros contactos se realicen en su propia verreaquera. Así el animal puede centrar su atención en el "nuevo objeto" que se le ha presentado. También es importante que estos primeros contactos se hagan en presencia exclusivamente de la persona encargada de su manejo.

El potro debe estar impregnado de olores que estimulen la libido que se consigue rociándolo con orina de cerda en celo o con semen de otro verraco. El operador debe realizar movimientos de vaivén con el maniquí para posteriormente mantenerlo inmóvil simulando la inmovilización de la hembra en celo. Si las circunstancias lo requieren se podrá imitar el gruñido de la cerda durante el entrenamiento o hablar para llamar la atención del macho acercándole al hocico un recipiente conteniendo semen de otro verraco para estimularlo y atraerlo al potro, colocando a continuación el recipiente sobre el maniquí para forzarle a montar si quiere alcanzarlo. Esta operación se puede realizar también con pienso.



Diseño básico de un potro de recogida

Las sesiones han de tener una duración de 15 minutos aproximadamente y frecuencia diaria, por la mañana y por la tarde. Una vez conseguido que el verraco salte sobre el maniquí, está conseguido lo más difícil. A continuación se debe habituar al macho al potro durante 2 semanas con intervalos de descanso de 3-4 días entre saltos y recogidas de semen. Terminado este período se entrará en un sistema más adecuado de ritmo de recogidas seminales de acuerdo a su concentración espermática; concentraciones de las que se obtengan menos de 15-18 dosis, 1 vez por semana, concentraciones superiores, 3 veces en dos semanas.



Producción de dosis seminal

03

Laboratorio, recolección y contrastación



Swine Artificial Insemination
KUBUS S.A.
Inseminación Artificial Porcina

3.1 Laboratorio de I.A.: Equipamiento mínimo necesario y opciones

Dependiendo del tamaño, funcionamiento del centro y del uso de material desechable o de vidrio a continuación se enumeran los distintos equipamientos para el laboratorio y opciones existentes:

Equipamiento de sala de recogida y laboratorio

- Potro de recogida
- Alfombra de goma
- Estufa de calentamiento y esterilización (de 40 a 121°C)
- Baño María
- Platina calentable a 37-39°C
- Agitador electromagnético con calefacción
- Sistema purificador de agua
- Microscopio binocular
- Cámara de video y monitor
- Colorímetro
- Balanza electrónica
- Estufas de doble temperatura Hot.Cold (de 4°C a 60°C).
- Tanque de dilución
- Nevera de 4°C para material farmacéutico y soluciones de contrastación.
- Bomba peristáltica para llenado de dosis.
- Selladora de tubos o blister
- Cuarto frío a 16°C (para almacenamiento de dosis).
- Estufa de conservación a 16°C para el almacenamiento de dosis.
- Termómetros máxima y mínima

Material de laboratorio

Para la recogida de los eyaculados

- Vasos de precipitado de vidrio de 250 cc /400 cc o vasos plásticos desechables
- Bolsas de plástico con o sin filtro incorporado
- Termos de recogida
- Filtros
- Gomas
- Guantes de látex o vinilo sin talco
- Guantes de plástico

Para la evaluación de la calidad seminal

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Probetas graduadas
- Cámara de Bürker
- Pipetas Pasteur
- Pipetas de 1 ml cristal o automática
- Pipetas de vidrio de 10 ml
- Matraces aforados de 100 ml
- Termómetros de alcohol o termómetro láser
- Gradillas y tubos de ensayo
- Suero fisiológico formolado
- Reactivos comunes: formaldehído al 40%, citrato sódico, cloruro sódico
- Reactivos para tinciones



Laboratorio: Zona de contrastación

Para la preparación de las dosis seminales

- Matraces Erlenmeyer de 2000 / 5000 ml
- Jarras de plástico 2000 / 5000 ml
- Bolsas de dilución
- Diluyente de semen de verraco
- Agua bidestilada o purificada
- Envases de dosis seminales (botellas, tubos, blister...)



Laboratorio: Tanque de dilución

Para la limpieza del material de laboratorio

- Escurridor de material
- Cepillos para limpieza
- Frasco lavador con cánula
- Papel de filtro o secante para mostradores
- Jabón neutro de laboratorio
- Desinfectantes para superficies

Para la inseminación

- Nevera portátil de transporte a 16°C alimentada con batería.
- Catéteres de inseminación: de caucho o desechables (espuma o espiral)
- Esterilizador de catéteres (sólo si se utilizan catéteres de caucho)
- Toallitas desinfectantes
- Guantes de látex o plástico
- Alforjas de inseminación
- Feromonas sintéticas en spray
- Baño María para calentamiento de dosis a 37°C
- Carro de inseminación.

Para la gestión del CIA

- Fichas de control de ritmos de recogida
- Fichas individuales de control de verracos
- Fichas de control de inseminación
- Software de Gestión del CIA y equipo informático

3.2 Mantenimiento y cuidado del material de laboratorio

Limpieza

La limpieza del laboratorio de inseminación artificial y del material utilizado para procesar las dosis seminales es imprescindible para mantener en perfectas condiciones la higiene del material de laboratorio y la conservación de las dosis seminales.

El laboratorio debe limpiarse después de cada jornada de trabajo y siempre que sea necesario.

Para que el ambiente en el laboratorio sea lo más aséptico posible, el material debe estar el menor tiempo posible sucio. Los pasos para su limpieza y esterilización son los siguientes:

- 1.- Enjabonado y lavado del material de vidrio con cepillo de laboratorio para eliminar la suciedad hidrófila y liposoluble. El jabón que se utilice en el laboratorio debe ser de pH neutro y no debe dejar ningún residuo que actúe como espermicida.
- 2.- Enjuagado con agua abundante para quitar restos de jabón.
- 3.- Aclarado posterior con agua destilada para eliminar los restos de agua corriente y las sales minerales.
- 4.- Escurrir el material de laboratorio.
- 5.- Una vez seco, el material de vidrio se introduce en la estufa de esterilización un mínimo de 20 minutos a 121° C.
- 6.- Después de la esterilización el material se tapa con papel de aluminio y se introduce en un armario cerrado para aislarlo del ambiente exterior.
- 7.- Limpieza de mostradores y puestos de trabajo al acabar la jornada: Limpiar con agua y jabón los restos de diluyente, semen, etc. que haya sobre las superficies, posteriormente, secar con papel limpio, pulverizar alcohol etílico al 70 % y dejar evaporar. Pueden usarse también desinfectantes de superficies para laboratorios.

Mantenimiento

- Control de las temperaturas de los aparatos: comprobación periódica de las oscilaciones de la estufa de conservación, baño de María, etc.... mediante el uso de termómetro de máxima-mínima o mediante el uso de registradores de temperatura (data-loggers).
- Limpieza periódica de baño de María
- Ajuste y limpieza periódica de microscopio.
- Limpieza y desinfección de las gomas de bomba peristáltica.
- Verificación o calibración periódica de los aparatos de medición: balanzas, termómetros, pipetas automáticas.

3.3 Recolección de semen

Cuando los verracos están habituados a saltar sobre el potro, la extracción del semen se debe realizar en un potro fijo ubicado en la sala de recolección. La sala de recolección debe asegurar las condiciones de higiene y de seguridad tanto para el animal como para el trabajador durante la recolección. Por la "seguridad del verraco" entendemos toda la actuación y/o elemento que evite las caídas y resbalones del animal así como su exposición a la presencia del otro verraco.

Todo el material que vaya a recibir y estar en contacto con el semen debe guardar unas condiciones indispensables:

- Debe estar aprobado como no espermicida.
- Debe estar limpio y esterilizado.
- Debe estar previamente atemperado a 37°C.

El eyaculado se recoge directamente en vaso de precipitado u otros recipientes desechables (vaso o bolsa de plástico) situados dentro de un termo para mantener la temperatura cercana a los 37°C. A la vez sobre el recipiente se coloca un filtro para que durante la recolección se impida la mezcla de la fracción espermática del eyaculado con el gel o tapioca u otras partículas extrañas. Actualmente, en el mercado están disponibles bolsas de recogida de plástico que llevan el filtro incorporado. La técnica más correcta para la extracción es la de "doble guante", donde el segundo guante, o guante externo, mantiene limpio el primero o interior hasta el momento inmediatamente anterior al inicio de la sujeción del pene para comenzar la recogida.

Cuando el animal está sobre el potro, se debe realizar un vaciado de la bolsa prepucial, presionando la misma para eliminar los restos de orina y líquidos prepuciales que hubiere. Con cierta frecuencia se aprovecha este momento del salto para el corte de pelo presente en la apertura del prepucio. Se limpia la zona con las toallitas desinfectantes que a continuación se desechan junto al primer guante de los dos que protegen la mano del operario.

Al exteriorizar el glande, el operario ha de sujetar el pene del verraco sin ejercer una gran presión y de tal forma que sus dedos queden al borde de la espiral del glande o "tirabuzón". Esto permite mediante suaves tirones, a extender del todo el pene y colocarlo en posición horizontal, posición que ha de mantenerse a lo largo del tiempo de eyaculación. Con eyaculados que tengan problemas de aglutinación es conveniente realizar la recolección sobre 100 cc. de diluyente MR-A® a 37°C. Al terminar la recogida, se desechan el filtro y el segundo guante.

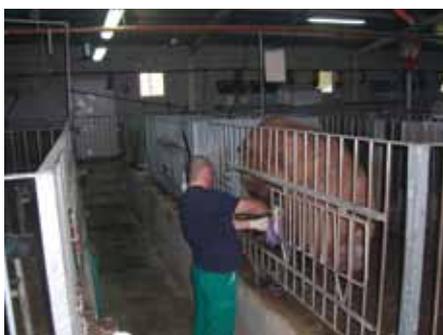


Recogida de semen

De inmediato, pasar el recipiente con el eyaculado al laboratorio a través de la ventana de comunicación.

Las ventajas de la recolección de semen sobre 100 cc de diluyente atemperado son:

- El semen cae sobre un medio adecuado.
- El diluyente empieza a "trabajar" inmediatamente.
- El líquido tiene menor variación de temperatura que un objeto de plástico u otro material inerte (termo, bolsa o vaso de recogida).
- Permite alargar el tiempo entre recogida y dilución del eyaculado. Sin diluyente, este tiempo no debe ser mayor de 15 min.
- Disminuye la aglutinación de los eyaculados.



Recogida desde el foso

¡ATENCIÓN!

No hay que hacer cambios en los cálculos de la concentración espermática del eyaculado, solo usar con esta finalidad el volumen de recogida (vol. semen + vol. diluyente) en vez de sólo el volumen de semen.

Fracciones del eyaculado

El eyaculado del verraco se compone de tres fracciones:

La fracción pre-espermática es la primera emisión de eyaculado. No interesa recogerla ya que no contiene espermatozoides y suele tener una carga altamente contaminante. Es transparente, muy líquida y de escaso volumen, 10-15 cc aproximadamente.

La fracción espermática o rica en espermatozoides viene a continuación de la primera fase y sale rápidamente debido a la primera contracción que sufre la cola del epidídimo. Es de color blanco y muy densa, de aspecto "lechoso". Tiene una gran concentración de espermatozoides y un volumen cercano a los 100 cc. Esta es la fracción que más nos interesa recolectar para la I.A.

La fracción post-espermática o pobre en espermatozoides está constituida por secreciones de las glándulas accesorias del aparato reproductor del verraco y con escasos espermatozoides. Es de color blanquecino transparente, con grumos gelatinosos a lo largo de su emisión, con un volumen aproximado de 200 cc. Puede estar intercalada con emisiones intermitentes de fracción rica, por lo que conviene estar atento para aprovecharlas durante la recogida. Esta fracción, al tener gran cantidad de plasma seminal, actúa estimulando a los espermatozoides, por lo que su utilización en I.A. no es recomendable si queremos conservar el semen por más de 24 horas. Sólo se recomienda recoger la parte más lechosa de esta fracción, dirigiendo la caída de la parte que es totalmente transparente fuera del termo.

Durante toda la eyaculación, sobre todo en la primera y tercera fase se expulsan unos grumos gelatinosos conocidos vulgarmente como "tapioca" procedentes de las glándulas de Cowper que actúan como tapón para el cervix de la cerda en condiciones de monta natural. Este gel o tapioca no interesa recoger ya que provoca la gelificación del líquido seminal y debe eliminarse con ayuda del filtro situado en el vaso o bolsa de recogida.

Una vez recogido el semen, debe llevarse inmediatamente al laboratorio para su contrastación y procesado.

Se realizará la recogida de la fracción rica o bien una fracción intermedia de 150 cc o superior cuando la concentración sea elevada y el número de dosis previstas para preparar nos indique que la dilución (semen-diluyente) puede ser superior a 1:25.

El grado de dilución de un eyaculado nos indica la relación entre el volumen de semen y de diluyente. Siempre debe estar entre 1:4 y un máximo de 1:25, debiendo saber que la mejor conservación de las dosis se obtiene cuando el grado de dilución se sitúa alrededor de 1:10.

La fórmula para el cálculo del grado de dilución es la siguiente:

$$\frac{(\text{Volumen de dosis} \times \text{N}^{\circ} \text{ de dosis}) - \text{Volumen de semen}^*}{\text{Volumen de semen}^*}$$

**Atención: Para conocer el volumen de semen si se recoge sobre diluyente hay que restar el volumen de diluyente añadido del volumen total de recogida.*

3.4 Contrastación del semen



Contrastación seminal

La contrastación o evaluación de semen es fundamental para detectar problemas de subfertilidad e infertilidad en el verraco, consecuencia de distintos factores que influyen sobre la calidad seminal, como son los factores medioambientales, el estado nutricional, condiciones sanitarias, etc.

Las técnicas de contrastación del semen en la práctica, deben cumplir tres requisitos: sencillez, rapidez y economía.

La evaluación del semen, valiéndose de diversas técnicas laboratoriales, permite en la actualidad obtener un informe de espermiograma con el que se puede determinar la calidad espermática con mucha precisión, lo cual es fundamental para optimizar al máximo el potencial reproductivo de los sementales.

Por una parte, estas técnicas de evaluación seminal permiten identificar a aquellos verracos que pueden estar produciendo semen con mala calidad, previniendo un descenso en los resultados de fertilidad y/o prolificidad obtenidos, y por otra parte, permiten identificar a los verracos con mejor calidad seminal, lo que determinará la optimización del uso de aquellos que tienen una mayor capacidad fecundante.

Podemos resumir las técnicas de contrastación, en el siguiente esquema:

Evaluación macroscópica:

- Color
- Olor
- Volumen

Métodos microscópicos:

- Motilidad
- Grado de aglutinación
- Concentración espermática
- Morfología del espermatozoide.
- Integridad de acrosomas.
- Funcionalidad espermática.
- Grado de contaminación.

Análisis bioquímicos:

Análisis enzimáticos:

- Determinación de AAT (aspartato amino transferasa)
- Determinación de acrosina

Composición del plasma seminal:

- Proteínas
- Calcio
- Zinc
- Magnesio

Composición fosfolipídica de membrana espermática

Estudios del nivel metabólico espermático

Análisis microbiológico:

Control de presencia de crecimiento de bacterias en semen diluido e identificación de gérmenes mediante cultivos bacteriológicos

Determinación del estado del núcleo espermático:

- Determinación de fragmentación del DNA mediante TUNEL o mediante COMET.
- Uso de cromomiocianina A3
- SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)
- SCDt (Sperm Chromatin Dispersion Test)

Pruebas de interacción espermatozoide-ovocito-oviducto:

- Test de unión de espermatozoide con zona pelúcida
- Test de penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida (SPA)
- Test de Fertilización In Vitro FIV homólogo
- Ensayo unión espermatozoide-oviducto

Evaluación seminal

Una vez el eyaculado llega al laboratorio, los parámetros que pueden evaluarse son los siguientes:

1. Color y olor:

Se observa si el color blanquecino del semen es nítido, o está enturbiado con otros tonos, como marrón, rojizo o amarillento. La aparición de colores u olores anómalos puede ser debida a alteraciones patológicas del aparato genital o a la mezcla del semen con orina durante la eyaculación.

2. Temperatura:

Se mide la temperatura del semen en el vaso de recogida antes de situarlo dentro del baño de María (o estufa de conservación) a una temperatura entre 33 -37°C dependiendo de la forma de trabajar. Comprobar que la diferencia de temperatura entre el eyaculado recogido y el baño de María no sea superior a 2°C. Si esto ocurre, se ajusta siempre la temperatura del baño de María a la temperatura del semen, nunca al revés. También se puede mantener el eyaculado a estas mismas temperaturas pero en una estufa de calor seco.

No mantener nunca más de 15 minutos el semen puro en el baño de María antes de la dilución, para evitar daños en la membrana espermática. Como se ha comentado, esta es una de las ventajas de recoger sobre 100cc de diluyente, ya que esta práctica permite alargar el tiempo entre la recogida y la dilución.

3. Volumen del eyaculado (Fracción rica):

Se cuantifica en cc o ml. Para realizar su medida se utilizan probetas graduadas o una balanza, pesando el eyaculado y habiendo tarado previamente el vaso de recogida. Se considera que 1gr = 1cc.

El volumen normal de la fracción rica del eyaculado oscila entre 50 y 150 cc aproximadamente. Varía según la edad, tamaño testicular, raza y estado fisiológico de cada verraco

4. Motilidad:

- Mediante visualización por microscopía:

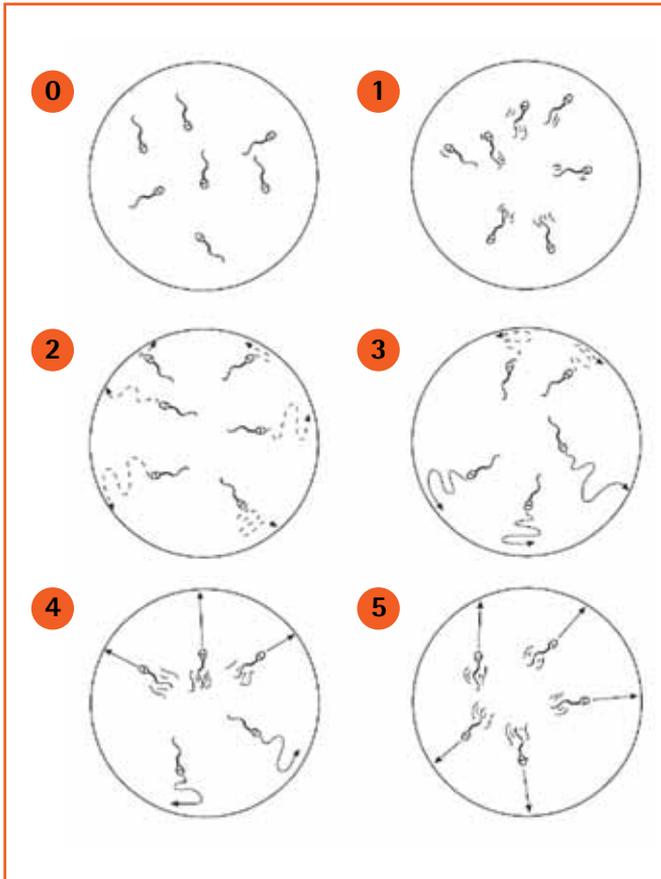
Se evalúa colocando una gota pequeña del eyaculado en un portaobjetos atemperado a 38 -39°C, y sobre ella se coloca el cubreobjetos. Para atemperar el material se necesita una platina calentable. La muestra se observa a través del microscopio a 100 - 200 aumentos, evaluando el movimiento general (valoración en porcentaje) y el tipo de movimiento individual (puntuación de 0 a 5).

En el caso de la evaluación de la motilidad en el semen conservado, se llevan a cabo dos observaciones: una se realiza con una gota de semen diluido y atemperado y la otra con una gota de semen diluido al que se le añade una gota de solución de cafeína (ver Anexo al final del capítulo), que nos sirve para determinar la capacidad real de movimiento de los espermatozoides.

- 0. Espermatozoides sin movimiento.

Espermatozoides con movimiento pobre, las cabezas de los espermatozoides quedan fijas, y sólo se mueven las colas, pudiendo girar sobre sí mismos. Espermatozoides sin movimiento progresivo.

- 1. Espermatozoides con desplazamiento en círculos y algunos progresivos.
- 2. Movimientos progresivos y sinuosos.
- 3. Movimientos progresivos rápidos.
- 4. Movimientos progresivos muy rápidos.



Clasificación del movimiento individual:

- Mediante sistemas automáticos de análisis de imágenes CASA (Computer Assisted Semen Analysis)

Permiten una evaluación objetiva de la motilidad. Permite un análisis de las trayectorias de los espermatozoides y su clasificación porcentual por:

- por progresividad (Estáticos, Móviles no progresivos, Móviles progresivos)
- por velocidad (Rápidos, Medios, Lentos, Estáticos)
- según la O.M.S: Progresivo rápido (tipo a); Progresivo lento (tipo b); No progresivo (tipo c); Inmóvil (tipo d)

5. Aglutinación:

Al evaluar la motilidad espermática, a veces se observan acúmulos de células más o menos grandes; es la aglutinación espermática. Ésta se evalúa de 0 a +++ , siendo las 3 cruces una aglutinación muy evidente. Al evaluar la motilidad de la muestra, las células aglutinadas no se consideran en el porcentaje total de células en movimiento.



Detalle de aglutinación

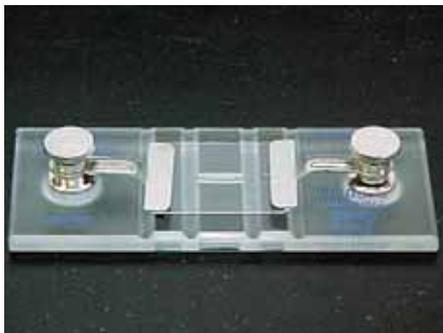
6. Concentración del eyaculado:

Es fundamental su cálculo, ya que en función de la concentración y del volumen del eyaculado, se podrá calcular el número de dosis a preparar. Consiste en la determinación del número de espermatozoides por unidad de volumen. Esta determinación se puede realizar por diferentes métodos, siendo los más usuales:

- Cámaras de recuento celular (Bürker, Neubauer, Thoma...).
- Colorimetría.
- Sistema integrado de conteo de espermatozoides mediante microscopía de fluorescencia (Nucleocounter).
- Sistemas automáticos de análisis de imágenes CASA (Computer Assisted Semen Analysis).

6.1. Recuento de espermatozoides con cámara de Bürker:

El recuento con la cámara de Bürker es el método más recomendado en centros de I.A. pequeños por su sencillez y bajo coste.



Cámara de Bürker

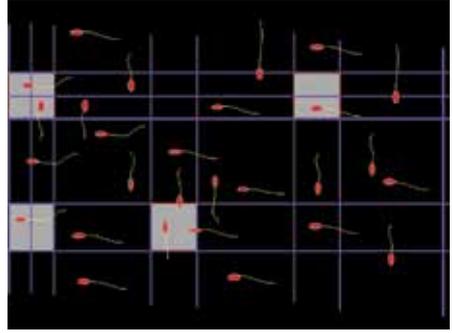


Matraz aforado

El procedimiento es el siguiente:

- Mezclar bien el eyaculado antes de tomar 1 ml de semen puro con la ayuda de una pipeta.
- Realizar una dilución 1:100 en una solución de suero fisiológico formulado al 3‰ (ver anexo), para lo que se utiliza un matraz aforado de 100 cc. Si se utiliza un matraz aforado de 50cc., entonces hay que añadir solamente 0,5 cc. de semen para mantener la misma proporción de dilución.
- Homogeneizar suavemente la mezcla, y tomar con una pipeta Pasteur una gota para llenar la cámara de Bürker.
- Ajustar bien el cubreobjetos en la cámara de Bürker.
- Situar la pipeta Pasteur entre el cubre y la cámara, dejando que el retículo de la cámara se llene por capilaridad.
- Observar en el microscopio en campo claro a 400 aumentos.
- Realizar el contaje de espermatozoides presentes en 40 cuadrados del retículo de la cámara (A).

Contaremos aquellos espermatozoides cuyas cabezas estén situadas dentro de los cuadros de la retícula, y aquellos cuya cabeza toque el lado superior, el lado derecho y las esquinas superior e inferior derechas del cuadro.



Vista de la Cámara de Bürker a través del microscopio

El área de los cuadros pequeños de la retícula viene especificada en la cámara de Bürker y es de 0.0025 mm². La altura entre la cámara y el cubre es de 0.1 mm. Por tanto, el volumen contenido en cada cuadro es de:

$$0.0025 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 0.00025 \text{ mm}^3$$

El volumen contenido en los 40 cuadros será:

$$0.00025 \text{ mm}^3 \times 40 = 0.01 \text{ mm}^3$$

A es el número de espermatozoides en 0.01 mm³. Para transformarlo en cm³:

$$\begin{aligned} & \mathbf{A \times 100} \\ & = \mathbf{n^\circ \text{ de espermatozoides en } 1 \text{ mm}^3 \times 1.000} \\ & = \mathbf{n^\circ \text{ de espermatozoides en } 1 \text{ cm}^3} \end{aligned}$$

Como se parte de una dilución 1:100 el contenido en espermatozoides del semen sin diluir será:

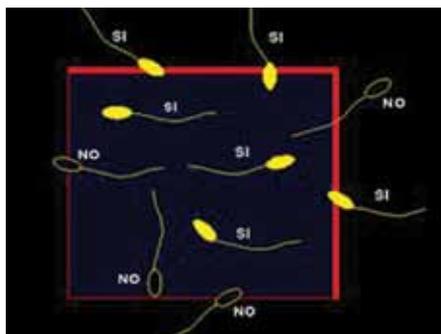
$$\begin{aligned} & \mathbf{A \times 100 \times 1.000 \times 100} \\ & = \mathbf{A \times 10^7 \text{ espermatozoides/cm}^3 \text{ de semen puro}} \end{aligned}$$

Para determinar el número total de espermatozoides del eyaculado se multiplica este valor por el volumen del eyaculado **V** en cm³:

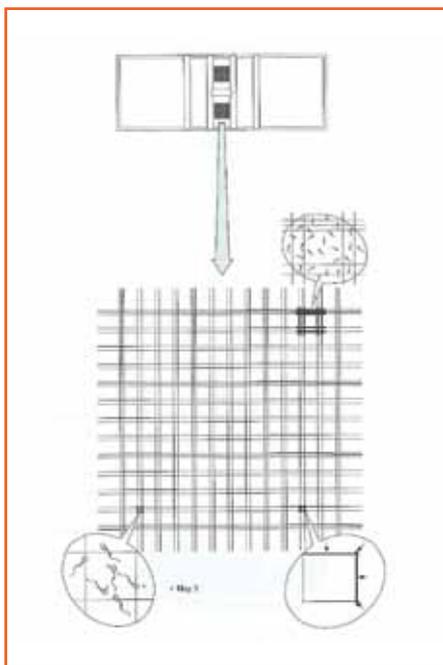
$$\begin{aligned} & \mathbf{\text{Total de espermatozoides por eyaculado (C)}} \\ & = \mathbf{V \times A \times 10^7} \end{aligned}$$



Vista real de un cuadrado de la cámara de Bürker (3 esperm.)



Detalle del recuento espermático con la cámara de Bürker



6.2. Colorimetría:

La determinación de la concentración a través del espectrofotómetro o colorímetro es un método muy utilizado en grandes centros de I.A. donde se requiere realizar recuentos de una gran cantidad de eyaculados. La colorimetría consiste en registrar la cantidad de luz absorbida por una muestra. El colorímetro contiene una



Colorímetro

célula fotoeléctrica que reacciona al paso de la luz a través de las cubetas, midiendo la distinta densidad óptica de las muestras seminales registrando distintos valores de absorbancia. Este método de estimación de la concentración se basa en la correlación que existe entre el número de espermatozoides por unidad de volumen con la opacidad del semen. Sin embargo, este método tiene el inconveniente de presentar importantes errores en la determinación de la concentración de espermatozoides presentes por la impredecible opalescencia del plasma seminal y porque la concentración de proteínas presentes en dicho plasma es muy variable. El colorímetro debe calibrarse con cierta frecuencia, para evitar los desajustes del aparato

Recta patrón del colorímetro:

La construcción de una recta patrón consiste en obtener para cada valor de absorbancia un valor de concentración espermática (millones de spz/ml). Este valor lo podemos obtener mediante contaje con cámara de Bürker o mediante otros sistemas como el Nucleocounter. Esto nos permitirá construir una recta patrón en la que existe una correspondencia entre los valores de absorbancia con distintas concentraciones de espermatozoides. Con los datos obtenidos, podemos obtener la recta patrón en Excel mediante un gráfico de dispersión que incluye la ecuación de la recta y el valor de coeficiente de regresión R^2 . La ecuación será más fiable cuanto más se acerque R^2 a 1.

Una vez obtenida una buena recta de calibración, el colorímetro proporciona un método rápido de determinación de la concentración del semen.

Medición de absorbancia en el colorímetro.

En el colorímetro, seleccionamos un filtro de 560 nm de longitud de onda (entre 520 y 590nm).

- Se introduce el tubo (cubeta) con la solución blanco (diluyente) y se hace blanco a valor 0 de absorbancia.
- Se extrae el tubo de la solución blanco y se introduce el tubo con la muestra, registrando la medida de absorbancia.

6.3. Sistema integrado de microscopía fluorescente (Nucleocounter):

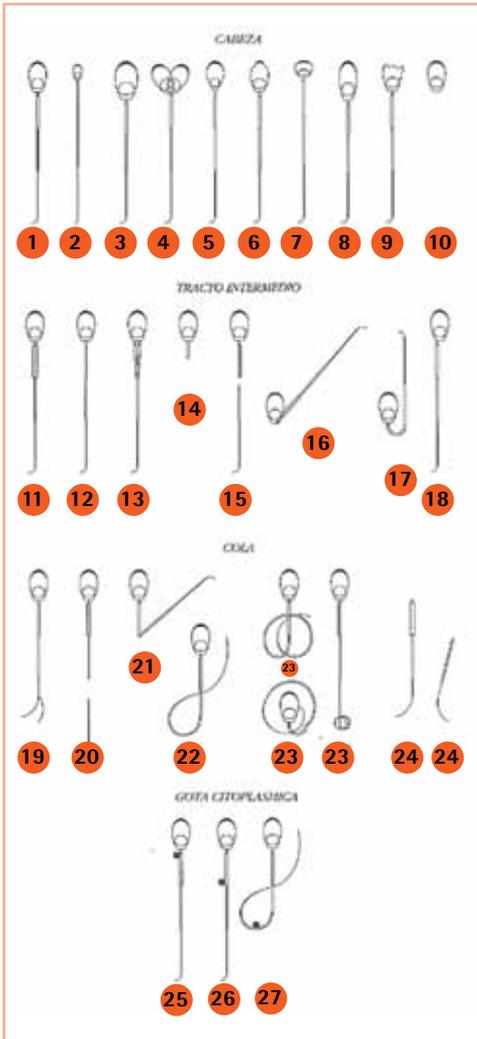
El Nucleocounter consiste en un microscopio de fluorescencia con un software integrado capaz de leer y contar las señales luminosas que desprenden los núcleos de las células espermáticas después de haber sido teñidas con yoduro de propidio y después excitadas con luz a una determinada longitud de onda. De esta forma, el Nucleocounter puede medir la concentración de semen de verraco, tanto puro como diluido en una dosis seminal.

Para realizar el conteo, previamente los espermatozoides se diluyen en un medio que provoca ruptura de las membranas plasmáticas para exponer el ADN de las células espermáticas al yoduro de propidio (fluorocromo con afinidad por los ácidos nucleicos). El aparato emite sobre la muestra luz verde que hace que el ADN unido al yoduro de propidio de cada espermatozoide se excite y emita una luz fluorescente que es detectada por el sistema de forma individual. El software solo interpreta como espermatozoide las señales luminosas que corresponden a espermatozoides y no las de otro tipo de células, bacterias ni artefactos, dando así un resultado más exacto. El resultado se ofrece en millones de espermatozoides/ml.

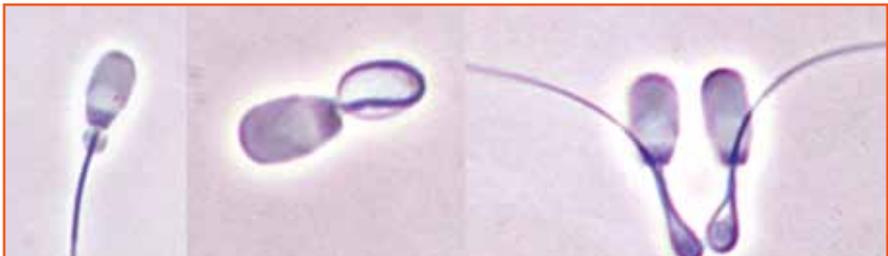
7. Formas anormales:

El cálculo del porcentaje de formas anormales puede realizarse:

- En el momento del recuento de espermatozoides en la cámara de Bürker
- Realizando una tinción total y observando con el microscopio de campo claro con objetivo de 40 o 100 aumentos las formas anormales existentes en 50-100 células contadas.
- Fijando una muestra con solución de citrato-formol (ver Anexo), y observando en un microscopio de contraste de fases las morfoanomalías existentes en 50-100 células contadas con objetivo de 40 o 100 aumentos.



- 1. Normal
- 2. Microcabeza
- 3. Macrocabeza
- 4. Doble
- 5. Piriforme
- 6. Afilada
- 7. Achatada
- 8. Alargada
- 9. Desintegrada
- 10. Suelta
- 11. Engrosado
- 12. Filiforme
- 13. Doble
- 14. Partido
- 15. Desprendido
- 16. Flexionado
- 17. Retorcido
- 18. Excéntrico
- 19. Doble
- 20. Partida
- 21. Flexionada
- 22. En látigo
- 23. En ovillo
- 24. Suelta
- 25. Proximal
- 26. Distal
- 27. Distal y cola en látigo



Formas anormales: Gota citoplasmática proximal, cola en látigo y cola en látigo

8. Estado del acrosoma:

El acrosoma es una estructura del espermatozoide situada en la parte anterior de la cabeza y que juega un papel fundamental en la fecundación, ya que contiene enzimas necesarios para la penetración del cúmulo oophorus y de la zona pelúcida del óvulo. Alteraciones del acrosoma o del proceso de capacitación inhiben la capacidad fecundante de la célula espermática. En un principio, el análisis del estado del acrosoma quedaba supeditado a laboratorios especializados que disponían de microscopio de contraste de fases y personal más cualificado que realizaba e interpretaba este tipo de análisis, sin embargo, cada vez es más frecuente que esta valoración se realice en los propios laboratorios de los centros de inseminación, sobre todo en los de gran tamaño.

8.1. Técnica de evaluación del estado del acrosoma mediante contraste de fases:

- Colocar en una gradilla pequeña tubos de ensayo con aproximadamente 2 ml de solución de citrato-formol o solución de glutaraldehído (ver Anexo).
- Tomar con una pajita o pipeta 1-2 gotas de las muestras del semen.
- En un portaobjetos limpio, poner una gota, y sobre ella colocar un cubreobjetos. Añadir una gota de aceite de inmersión.
- Observar la integridad de los acrosomas con el microscopio de contraste de fases: a 1000 aumentos (objetivo de inmersión 100x)
- Realizar el contaje de acrosomas normales y dañados, observando un mínimo de 50 -100 espermatozoides.



- 1. Acrosoma normal
- 2. Acrosoma dañado
- 3. Acrosoma perdiendo
- 4. Acrosoma perdido

Cuando el acrosoma está íntegro, se observa una especie de semiluna oscura en la parte más externa de la cabeza del espermatozoide. El acrosoma normal tiene la membrana con bordes muy nítidos, sin ninguna irregularidad. Cuando el acrosoma empieza a dañarse, se observan pequeñas rugosidades en la membrana, y al avanzar el deterioro, aparecen pequeñas escotaduras e irregularidades, cada vez más visibles.



Acrosoma íntegro



Acrosoma dañado, perdiendo y perdido

8.2. Técnica de evaluación del acrosoma mediante tinciones no fluorescentes:

Tinción con Giemsa

Este método de tinción permite valorar el estado del acrosoma.

Reactivos:

- Giemsa 3 ml
- Solución Sorensen 2 ml
- Agua destilada 45 ml

Procedimiento:

Fijar la muestra con solución salina formolada (5%) durante 15 minutos. Cubrir la extensión con Giemsa durante 90 minutos. Lavar y secar.

Tinción con Azul de Anilina

Permite diferenciar morfológicamente células espermáticas con acrosoma íntegro y dañado, usando microscopio óptico simple.

Reactivos:

- Solución PBS, pH 7,2
- Glutaraldehído al 3% en PBS
- Solución al 2% de ácido acético
- Azul de anilina

Procedimiento:

- Centrifugar 10 ml de semen diluido. Eliminar el sobrenadante y agregar igual volumen de MRA y homogenizar.
- Gotear en lámina portaobjeto y secar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos.
- Fijar en glutaraldehído al 3% por inmersión, durante 15 minutos.
- Escurrir y dejar secar a temperatura ambiente, durante de 15 minutos.
- Sumergir 5 a 6 veces en agua destilada, escurrir el exceso sobre papel de filtro.
- Sumergir en azul de anilina, durante 30 min. Cubrir con agua destilada, hasta eliminar restos de colorante. Después, lavar con frasco lavador, por ambos lados de la lámina. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Observar la tinción con microscopio óptico con objetivo de inmersión de 100x.



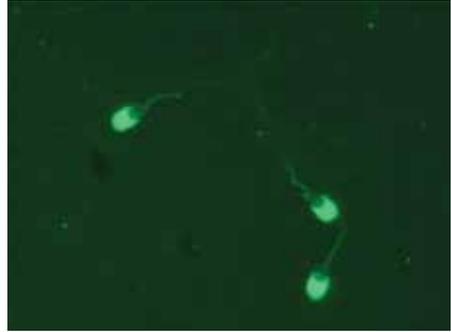
Tinción con Azul de Anilina

8.2. Técnica de evaluación del acrosoma mediante tinciones fluorescentes:

no

Mediante lectinas unidas a fluorocromos:

- PSA-FITC (conjugado de *Pisum Sativum* con fluoresceína isotiocianato): se une a glicoproteína de la parte externa de la membrana acrosomal.
- PNA-FITC (conjugado de *Arachis Hypogea* con fluoresceína isotiocianato): se une a glicoconjugados de matriz acrosomal.
- SBTI-Alexa Fluor 488 (conjugado de Soybean Trypsin Inhibitor con el fluorocromo Alexa Fluor 488): se une a la acrosina, proteasa acrosomal.
- Otros compuestos como LysoTracker Green compuesto que penetra en acrosoma íntegro (con pH ácido 5) manteniendo la fluorescencia si su membrana está íntegra; o mediante inmunofluorescencia indirecta por anticuerpos monoclonales o policlonales unidos a colorantes fluorescentes, en la que éstos se unen a antígenos de membrana o de la matriz acrosómica.



Acrosomas teñidos con PSA-FITC con permeabilización previa de membrana

9. CONTAMINACIÓN:

Se puede evaluar mediante contraste de fases además, de forma general el grado de contaminación (presencia de bacterias, células de descamación, plasma seminal...) existente de grado 0 a 3 cruces (+++) o mediante tinciones tipo Panóptico Rápido.

10. TINCIONES VITALES

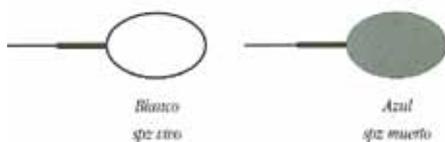
Las tinciones vitales se utilizan para poner en evidencia la integridad estructural de la membrana espermática mediante el uso de colorantes no permeables que sólo penetraran en el interior de la célula si la membrana no está íntegra. Puede realizarse mediante tinciones no fluorescentes (ejemplo: Tripán Azul) y mediante tinciones fluorescentes (yoduro de propidio)

10.1. Tinción con Tripán Azul

Reactivos:

- 2 gr de Tripán Azul.
- 100cc de diluyente.
- Procedimiento:
 - Dilución del Tripán Azul en el mismo medio de dilución que los espermatozoides.
 - Mezcla de la muestra espermática con un volumen igual de solución de Tripán Azul 1:1 v/v.
 - Incubación de la dilución durante 15 minutos a 37°C.
 - Extensión sobre un porta-objetos atemperado y secado al aire.

Se observarán en microscopio de campo claro: espermatozoides con cabeza blanca (sin teñir) se corresponden con espermatozoides vivos y espermatozoides con cabeza azulada (teñidos) que se clasifican como espermatozoides muertos



Tinción con Tripán Azul

10.2. Tinción mediante Hancock stain (eosina-nigrosina)

Reactivos:

- Colorante Hancock Stain (colorante a base de eosina nigrosina)

Procedimiento:

- Calentar las láminas portaobjetos sobre la platina a 37°C.
- Colocar en un extremo de la lámina portaobjeto, una gota del colorante Hancock (aproximadamente 0,1 ml).

- Con la pipeta pasteur, agregar sobre el colorante una gota de semen puro recién colectado (aproximadamente 0,1 ml). Mezclar suavemente.
- Cubrir la lámina portaobjeto con una placa petri e incubar durante 30 minutos.
- Con una lámina portaobjetos biselada se realiza una extensión a 45°.
- Secar el preparado a temperatura ambiente.
- Observar las células espermáticas con microscopio óptico a 100x.
- Contar un total de 100 células, entre células no coloreadas y brillantes (células vivas) y células coloreadas (células muertas) realizando un recorrido por el portaobjeto.
- Obtener el porcentaje de células vivas y células muertas.

11. PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA.

Ayudan a determinar no sólo la Integridad estructural de la membrana del espermatozoide y sino también su funcionalidad.

11.1. Mediante tests osmóticos:

A) Test de endósmosis o HOST (Hypo-osmotic swelling test)

Se valora el porcentaje de espermatozoides con membrana sin alteración estructural que sufren de enrollamiento de la cola tras la incubación en un medio hipo-osmótico.



*Tinción con eosina-nigrosina
(Hancock Stain)*



Test de endósmosis (HOST)

Para ello se incubaron en un baño María 37°C, 100 µl de semen en 1 ml de una solución hipo-osmótica (150 mOsm/Kg). Tras una hora de incubación se fija una muestra en una solución al 0.2% de formaldehído o glutaraldehído.

Existe una modalidad de HOST con reducción en el tiempo de incubación.

B) Test de resistencia osmótica (O.R.T)

Este test permite hacer una valoración de la resistencia de las membranas del espermatozoide a través de unas pruebas de resistencia frente a la temperatura durante un período prolongado de incubación y frente a un choque osmótico, con lo que queda de manifiesto la resistencia de la membrana espermática, especialmente la acrosómica.

Material necesario:

- Tubos de ensayo de 5 ml.
- Viales de 2 ml.
- Gradillas.
- Pipetas de 1 ml.
- Solución isosmótica (MR-A®)
- Solución hipotónica (a 50 ml de diluyente MR-A® se añaden 50 ml de agua destilada).
- Solución para fijación (glutaraldehído o formaldehído) (ver Anexo).
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Contador celular.
- Microscopio de contraste de fases.

Técnica:

Se ponen 3 ml de diluyente isosmótico en un tubo de ensayo y en otro 3 ml de diluyente hipotónico a 37°C. Se añade 0,2 ml de la fracción espermática del eyaculado a cada tubo con los diluyentes preparados anteriormente y se incuban en baño de María a 37°C. A los 15 minutos de incubación, se toma una muestra de la dilución con diluyente isosmótico, y se fija con la solución de formaldehído o glutaraldehído (ver anexo) y se calcula el porcentaje de acrosomas normales (a).

A las 2 horas de incubación, se toma una muestra de la dilución con diluyente hipotónico, se fija de la misma manera y se calcula el porcentaje de acrosomas normales (b).

El cálculo del valor O.R.T. se realiza calculando la media de los dos recuentos:

$$\text{O.R.T.} = \frac{\% \text{ Acrosomas a} + \% \text{ Acrosomas b}}{2}$$

La categoría de O.R.T se obtiene con la tabla siguiente:

Categorías	Valores de O.R.T.
Categoría 1	69-100
Categoría 2	59-68
Categoría 3	0-58

La categoría 1 corresponde a las clases 4 y 5, la categoría 2 corresponde a la clase 3 y la categoría 3 a los grupos 1 y 2 de la clasificación de Schilling (1986):

Clases	Valores de O.R.T.
Clase 1	36-46
Clase 2	47-57
Clase 3	58-68
Clase 4	69-79
Clase 5	80-82

Esta prueba tiene una valoración muy alta en un laboratorio de inseminación artificial, puesto que se ha demostrado que tiene correlación con:

- Capacidad de conservación.
- Resultados de fertilidad y prolificidad.
- Formación de grupos para el uso de semen heterospermico

11.2. Mediante tinciones fluorescentes:

Se usan colorantes membrana-permeables fluorescentes, que al traspasar al interior del espermatozoide son hidrolizados por las esterasas del interior de la célula, liberando un compuesto químico que presenta fluorescencia y que queda retenido en el interior del citoplasma si la membrana está íntegra, como por ejemplo DCF (diacetato de carboxifluoresceína) y el SYBR-14.

Tinción vital mediante SYBR-14-PI (Yoduro de propidio):

Se usa esta combinación de fluorocromos, realizando la evaluación mediante microscopio de fluorescencia o citómetro de flujo. Permite determinar si la membrana espermática está estructuralmente íntegra, y funcionalmente activa.

Protocolo para microscopio:

- 1. Diluir el semen a una concentración de 5-10 millones de espermatozoides por ml.
- 2. Añadir una alícuota de 1 μ l de SYBR-14 en DMSO a 1000 μ l de semen diluido.
- 3. Incubar 10 minutos a 37°C.
- 4. Añadir 5 μ l de yoduro de propidio.
- 5. Incubar 5 minutos a 37°C.
- 6. Observar con microscopio de fluorescencia. Los espermatozoides verdes son aquellos con la membrana estructural y funcionalmente activa. Los rojos corresponden a espermatozoides muertos. Los que se tiñen con los dos colorantes se corresponden a los espermatozoides moribundos. Contar 300 espermatozoides.



Tinción vital mediante SYBR-14 - PI (Yoduro de propidio)

12. Otras técnicas de valoración seminal:

- Estado de la vaina mitocondrial

Se usan colorantes fluorescentes que se unen específicamente a lípidos de membrana de las mitocondrias funcionales. No se retienen en membranas no funcionales con el potencial de membrana alterado (Rodamina 123, Mitotracker Green...).

- Test combinados:

Triple tinción no fluorescente

Esta técnica nos permite valorar la vitalidad del espermatozoide y el estado de su estructura acrosómica. La aplicación de esta tinción permite clasificar a los espermatozoides en cuatro grupos: muertos y no reaccionados, muertos y reaccionados (falsa reacción acrosómica), vivos y no reaccionados y vivos y reaccionados (verdadera reacción acrosómica).

Reactivos:

- Tripán Azul (2%)
- Bismark marrón-Y pH 2,8.
- Rosa Bengala pH 4,3.
- Tampón cacodilato con 3% glutaraldehído pH 7,4.

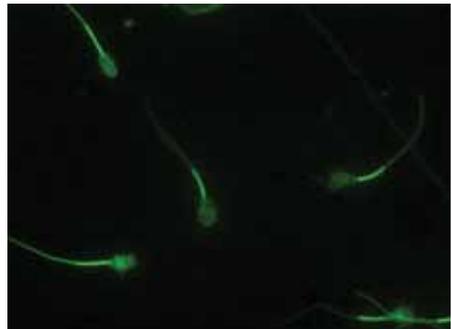
El Tripán Azul tiñe los espermatozoides muertos. El Bismark marrón tiñe la región postacrosomal y sirve para dar contraste y prevenir que el Rosa Bengala no se fije en dicha zona. El Rosa Bengala tiñe el acrosoma de color rosa.

Triple tinción fluorescente

Esta técnica permite evaluar la integridad de membrana, estado del acrosoma, y funcionalidad de mitocondria.

Reactivos:

- Bisbenzimidida
- PI
- SBTI-Alexa Fluor 488
- Mitotracker Green



Triple tinción fluorescente (filtro FITC)

- Valoración del daño oxidativo de las membranas espermáticas:

La producción de sustancias oxígeno reactivas (ROS) es indicativo del daño oxidativo que sufren las membranas espermáticas, siendo éste frecuente en espermatozoides conservados.

La producción ROS se puede valorar mediante tinción fluorescente (CM-H2DCFDA/PI).

- Valoración del inicio de capacitación espermática:

- Ensayo de transposición de fosfolípidos: la fosfatidil serina (PS) pasa al exterior de la membrana con distintos patrones según sea provocado por shock térmico o por inicio de capacitación. Se usa la Anexina V-FITC combinada con PI.

- Monitorización de cambios tempranos en la permeabilidad de membrana: SNARF/Yo-Pro1/HE.

- Valoración de la capacitación y reacción acrosómica mediante el uso de CTC (clortetraciclina) que monitoriza los cambios de Calcio intracelular, asociados a la capacitación.

- Cambios en el empaquetamiento de lípidos mediante la Merocianina 540: si existe desorden lipídico e incremento de la fluidez de la membrana, se produce incremento de la fluorescencia emitida por la Merocianina.

- Estado del núcleo espermático

- Determinación de fragmentación del DNA mediante TUNEL: identificación de grupos 3-OH de terminales libres de nucleótidos.

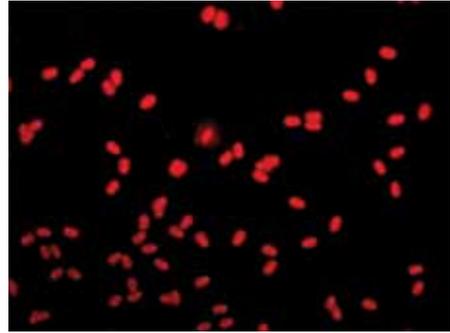
- Detección de fragmentación mediante COMET: se realiza un lisado de espermatozoides, después electroforesis en gel de agarosa, y revelado con sonda de DNA. A mayor cola obtenida, mayor fragmentación.

- Uso de cromomiocianina A3: detecta deficiencia de protamina en cromatina deficientemente condensada.

- SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay): detecta defectos en la condensación de la cromatina. Se somete al espermatozoide a un tratamiento desnaturalizante, después se tiñe con AO (naranja de acridina), que se une a DNA de cadena doble (naranja) o sencilla (verde). La lectura se realiza en citómetro de flujo.

- SCDt (Sperm Chromatin Dispersion Test): se somete a un tratamiento de lisis a los espermatozoides, y la dispersión del DNA se realiza en porta con agarosa, visualizándose la fragmentación del DNA mediante tinción de Wright o con tinción con un fluorocromo con afinidad por los ácidos nucleicos.

- Pruebas interacción espermatozoide-ovocito-oviducto:
 - Test de unión de espermatozoide con zona pelúcida.
 - Test de penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida (SPA).
 - Test de Fertilización In Vitro FIV homólogo (evalúa unión y penetración a zona pelúcida).
 - Ensayo unión espermatozoide-oviducto.



Fragmentación SCDt

3.5. Elaboración de dosis seminales

Preparación del diluyente.

- 1. Medir el volumen de agua destilada a 37°C, (con una probeta o mediante una balanza) según el formato de envase del diluyente e introducirla en un recipiente (matraz Erlenmeyer o bolsa).
- 2. Añadir el diluyente necesario para cada litro de agua purificada.
- 3. Mezclar durante 5 minutos de forma manual o ayudándose de un agitador electromagnético hasta la completa disolución del polvo del diluyente.



Preparación del diluyente

Actualmente, existe en el mercado diluyente líquido listo para usar, lo que facilita la producción de dosis seminales sobre todo en centros de pequeño o mediano tamaño.

Las ventajas de la utilización del diluyente líquido son:

- "Listo para usar".
- Rápido.
- Económico.
- Evita problemas con la calidad de agua.
- Fácil de usar: dispone de grifo dispensador.
- Higiénico, evita contaminaciones.
- Estable a temperatura ambiente.



Diluyente líquido

Preparación de dosis seminales.

Una vez que la calidad del semen ha sido evaluada y se le ha considerado apta para la I.A., conociendo la concentración espermática por mm³ pasamos a calcular el nº de dosis que se pueden obtener de ese eyaculado.

Podemos considerar que la dosis mínima recomendada para la inseminación convencional tiene una concentración de 2 x 10⁹ espermatozoides, sin embargo la de uso más corriente es de 3 x 10⁹ espermatozoides para semen de buena calidad espermática, es decir que tenga niveles bajos de morfoanomalías y otras alteraciones.

Cálculo de dosis: (Ver contaje en cámara de Bürker)

$$\text{Nº de dosis} = \frac{\text{Nº Total espermatozoides}}{\text{Nº Espermatozoides / dosis}} = \frac{V \times A \times 10^7}{3 \times 10^9}$$

Forma simplificada:

$$N = \frac{(A) \times (V)}{300} \quad \text{ó} \quad N = \frac{(C) \text{ Total}}{300}$$

El cálculo de la cantidad de diluyente necesario para la preparación de las dosis seminales se realiza de la siguiente forma:

Dosis seminales de 90 cc.

$$N \times 90 = \text{Vol. Total (Vol. diluyente + Vol. eyaculado)}$$
$$(N \times 90) - V = \text{Volumen de diluyente necesario a añadir}$$

V = Volumen de Recogida. Hay que tener en cuenta que, si se recoge sobre diluyente, 50 ó 100 cc, el volumen de recogida es igual al volumen de diluyente que se añade previamente más el volumen de del eyaculado recogido.

Ejemplo:

Tenemos un eyaculado con un volumen de 125 cc y recogemos sobre 100 cc de diluyente, luego el volumen V será de 225 cc.

El contaje total de cámara de Bürker A es de 37 espermatozoides.

Si trabajamos a una concentración por dosis de 3.000 millones de espermatozoides, el número de dosis que podremos hacer será:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de dosis a } 3 \times 10^9 = \frac{V \times A}{300} = \frac{225 \times 37}{300} = 27 \text{ dosis}$$

Es decir, $(27 \text{ dosis} \times 90) - 225 = 2.205$ cc de diluyente a añadir.

En resumen, la fórmula que tendríamos que aplicar dependiendo de la concentración usada, sería ésta:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de dosis a } 3 \times 10^9 = \frac{\text{Vol. de recogida} \times \text{N}^{\circ} \text{ spz contados en cámara}}{300}$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ de dosis a } 2,5 \times 10^9 = \frac{\text{Vol. de recogida} \times \text{N}^{\circ} \text{ spz contados en cámara}}{250}$$

Antes de mezclar semen y diluyente, se debe comprobar que no exista diferencia de temperatura entre ambos; lo cual se facilita si durante todo el procedimiento de contrastación se mantienen atemperados tanto semen como el diluyente. Añadir suavemente el eyaculado sobre el diluyente, permitiendo su mezcla homogénea. Una vez realizada la dilución, comprobar la motilidad de la mezcla.

Finalmente se envasan las dosis de semen diluido en las botellas de inseminación, tubos o blisters identificadas con una etiqueta con los siguientes datos como mínimo:

Nº de verraco

Raza

Fecha de preparación/fecha de caducidad

Reservar muestra en un tubo de ensayo con tapón para analizar los acrosomas el mismo día de recogida, y en días sucesivos motilidad. La forma más adecuada de conservar las muestras es en tubos de ensayo pequeños de 3 – 4 cc llenos hasta el borde, de forma que la cámara de aire sea mínima, o en microtubos de centrífuga Eppendorf de 1,50 – 2,00 cc (uno por día de valoración, de forma que ninguna muestra regrese a la nevera de conservación una vez que se ha sacado y abierto).

Una vez envasadas las dosis seminales, deben permanecer a temperatura ambiente (20–25°C) durante al menos 1,5 a dos horas, para que la temperatura descienda lo más gradualmente posible. Pasado este tiempo, podemos almacenarlas en la nevera de conservación de 16°C o en cuarto frío.

Utilización de semen heterospérmico

La utilización de dosis que contienen espermatozoides procedentes de dos o más eyaculados (heterospermia), es una práctica habitual en centros de inseminación, y que permite la obtención de mejores resultados reproductivos.

Cuando se empezó a trabajar con esta técnica era necesario clasificar previamente los eyaculados según el test de resistencia osmótica (ORT) (García y col. 1989) y mezclarlos dentro de la misma categoría.

Grupo O.R.T	Nº Verraco	Nº Cerdas	Fertilidad %	Prolificidad	L x 100
2	3	86	90.1	10.84	977
3	3	87	85.28	10.5	895
4-5	3	52	71.9	9.07	652

Posteriormente, antes de mezclar los eyaculados había que realizar una dilución previa 1:10 (semen/diluyente) incubarla 1/2 hora a temperatura ambiente y finalmente preparar el semen heterospérmico (Martín Rillo y col. 1988).

En la actualidad, todo este proceso no es estrictamente necesario, habiéndose comprobado que se obtienen igualmente buenos resultados cuando se mezclan eyaculados de calidad seminal similar (motilidad, formas anormales, aglutinación y acrosomas), sin necesidad de realizar el test ORT. Es importante no mezclar eyaculados de baja calidad con otros de alta, ya que los de baja calidad no mejoran por efecto de los mejores sino que son los de mejor calidad los que se ven empobrecidos por el efecto de los de inferior calidad.

Con la utilización de semen heterospérmico debemos esperar los siguientes resultados:

- No afecta a la fertilidad.
- Mejora la prolificidad, aumentando el número de lechones nacidos vivos.
- No tiene ningún efecto sobre el número de nacidos muertos.
- Incrementa el número de total de lechones nacidos.
- Disminuye el porcentaje de camadas reducidas ($NT \leq 8$)

Método de preparación de dosis heterospérmicas

En resumen, el proceso de preparación de dosis heterospérmicas es el siguiente:

- Contrastación individual de cada uno de los eyaculados.
- En un recipiente o bolsa de tamaño adecuado añadir el diluyente necesario para cada uno de los eyaculados.

- Añadir de forma lenta y uno detrás de otro todos los eyaculados que conforman el lote, normalmente de 3 a 5 machos.
- Homogeneizar la mezcla.
- Tomar una muestra para evaluar al microscopio el resultado de la mezcla.
- Iniciar el proceso de llenado de las dosis.

3.6. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DEL DILUYENTE.

Los diluyentes deben cumplir dos objetivos principalmente:

- a) Permitir el grado máximo de extensión o aumentar el volumen del eyaculado sin afectar la calidad seminal.
- b) Conservar la capacidad fecundante de los espermatozoides durante el mayor tiempo posible.

Los diluyentes de semen de verraco que se emplean en la inseminación artificial de las cerdas son una mezcla de productos químicos que han de asegurar la vida y la funcionalidad de los espermatozoides, es decir, su capacidad fecundante, desde el momento de su extracción hasta la inseminación y fecundación.

La composición del diluyente y la del agua en la cual será reconstituido han de asegurar la corrección en los siguientes parámetros:

- Presión osmótica del medio de suspensión de los espermatozoides.
- pH, pK y fuerza iónica de interacción entre los espermatozoides y su medio.
- Control de la precipitación de las proteínas y las aglutinaciones.
- Control de la acción enzimática sobre el semen, en particular de la que influye en el metabolismo y apoptosis de los espermatozoides.
- Preservación de la membrana celular de los espermatozoides.
- Capacidad de amortiguación de los cambios de los valores químicos, llamado efecto "tampón".

De los diluyentes se espera que también ejerzan un control sobre la contaminación microbiana. El Departamento Técnico de KUBUS es partidario de que este control se ejerza contra las contaminaciones secundarias y nunca sirva de "cobertura y solución" de los posibles problemas sanitarios del centro y de los verracos.

Los diluyentes, aparte de su función como medio de conservación, han de servir de medio de transporte de los espermatozoides por las vías reproductivas de la cerda, asegurándoles la fuente de energía necesaria para tal esfuerzo.

Las nuevas técnicas y herramientas de colocación de los espermatozoides en uno u otro punto del aparato reproductor, inclusive en la cercanía del ovario, así como el volumen cada vez menor de la dosis seminal, reducen la importancia de los componentes de los diluyentes que influyen sobre el estado de las mucosas del útero y de los cuernos uterinos.

Los diluyentes se presentan en forma de polvo para reconstituir en agua purificada o ya reconstituidos, en forma de líquido listo para su empleo, previa elevación de la temperatura del medio a la temperatura de los eyaculados.

Según la capacidad de los diluyentes para ralentizar el metabolismo de los espermatozoides, las dosis seminales se clasifican en corta, media y larga conservación, por el tiempo en que éstos se conservan sin mermar sus facultades fecundantes a la hora de su empleo.

Para permitir la acción correcta de los componentes del diluyente sobre los espermatozoides, está indicada la utilización de agua purificada, como mínimo bidestilada, no recomendándose el uso de cualquier otro tipo de agua que contenga minerales en su composición. (Ver anexo 12.3)

3.7. CONSERVACIÓN DE LAS DOSIS SEMINALES.

Para que el semen diluido mantenga su capacidad fecundante a lo largo de su almacenamiento en refrigeración a 16°C, es indispensable cumplir las siguientes condiciones:

- El material que esté en contacto con el semen debe estar previamente limpio y esterilizado, sin residuos químicos ni biológicos.
- Utilizar agua purificada contrastada y que no esté alterada bioquímica ni microbiológicamente.
- Utilizar diluyente de larga conservación.
- Recoger la fracción espermática del eyaculado para reducir las sales que se encuentran en el plasma seminal.
- Diluir en un período inferior a 15 minutos desde la recogida del semen, con una dilución semen:diluyente entre 1:4 y 1:25; (grado de dilución óptimo 1:10) a 37°C. Concentración mínima por dosis 2×10^9 espermatozoides en 100 cc y máxima de 8×10^9 espermatozoides en 100 cc.
- Descender lentamente la temperatura de 37°C a 23°C (durante 1,5 - 2 horas) a la temperatura ambiente del laboratorio (entre 20 - 25°C) y posteriormente introducir en la estufa de 16° C.
- Conservar en anaerobiosis a 16°C; por lo que no se debe dejar en las botellas un espacio de aire superior al 20% de su volumen.

- Comprobar la temperatura en el interior de nevera de conservación mediante termómetro de máxima-mínima o la utilización de "data-loggers".
- No exponer durante periodos largos de tiempo a la luz directa.
- El semen almacenado debe ser rotado (mezclado) suavemente cada 12 horas con objeto de mantener a los espermatozoides en suspensión en el diluyente.
- Las dosis seminales almacenadas antes de ser utilizadas deben ser observadas en el microscopio (motilidad) para comprobar si guardan la suficiente viabilidad para ser utilizadas.
- En el caso de eyaculados concentración espermática elevada, que producen un número muy alto de dosis seminales, por ejemplo superior a 30, es recomendable, cuando se preparan dosis de 85 - 90 cc, realizar una recogida con más volumen de semen: entre 100 y 150 cc de fracción rica como mínimo, para mantener una dilución próxima a 1:20 - 1:25, evitando diluciones superiores que disminuyen el período de conservación.



Nevera de conservación a 16°C

3.8. ANEXO

Soluciones necesarias para la contrastación

Solución de Glutaraldehído:

Glucosa.....	2,9 gr.
Citrato sódico.....	1,0 gr.
Bicarbonato sódico.....	0,2 gr.
Glutaraldehído (25% de pureza).....	8 ml.
Agua destilada.....	hasta 100 ml.

Solución de Citrato-Formol:

Citrato sódico.....	2,9 gr.
Formaldehído (40% de pureza).....	4 ml.
Agua destilada.....	hasta 100 ml

Solución de Suero fisiológico Formolado:

Cloruro de Sodio.....	9 gr.
Formaldehído (40% de pureza).....	3 gr.
Agua destilada.....	hasta 1000 ml.

Solución de Cafeína:

Citrato sódico.....	2,9 gr.
Cafeína.....	0,45 gr.
Agua destilada.....	hasta 100 ml.

04

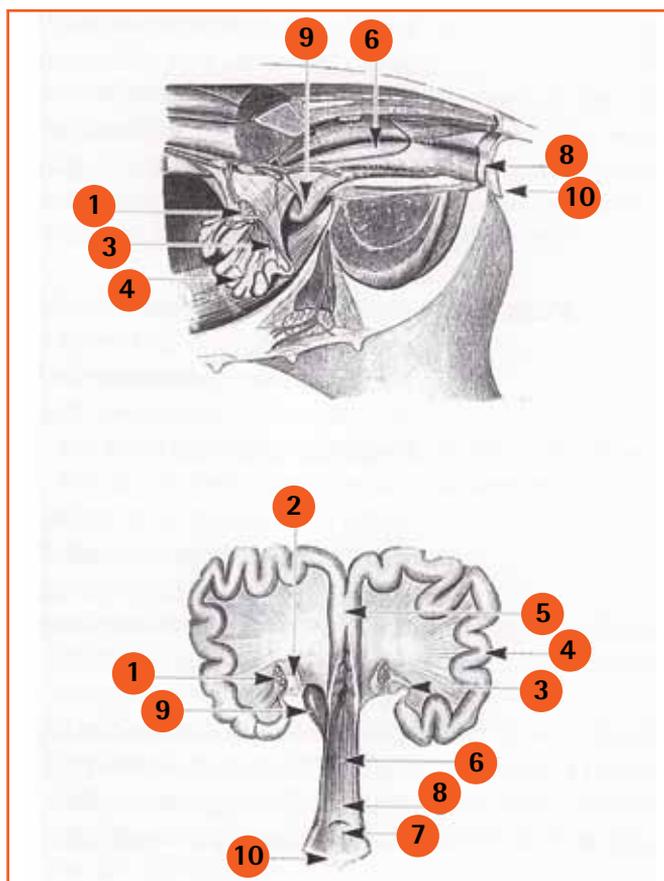
La Cerda



Swine Artificial Insemination
KUBUS S.A.
Inseminación Artificial Porcina

2.2 Anatomía del aparato genital femenino

- 1. Ovario.
- 2. Mesovario.
- 3. Oviducto.
- 4. Cuerno del útero.
- 5. Cuerpo del útero.
- 6. Vagina.
- 7. Orificio uretral.
- 8. Vestíbulo vaginal.
- 9. Vejiga.
- 10. Labios de la vulva.



El aparato genital de la cerda se caracteriza por tener los cuernos uterinos muy largos, flexuosos y móviles, lo que implica la necesidad de un gran volumen de eyaculado para asegurar la llegada de los espermatozoides al oviducto.

En el suelo de la vagina se encuentra el orificio uretral externo lo que hay que tener en cuenta a la hora de inseminar, ya que es frecuente introducir el catéter de inseminación por este orificio y provocar la salida de orina por el mismo. Esta es la razón de inseminar dirigiendo el catéter hacia el techo de la vagina. El cuello uterino tiene una serie de pliegues en los que se adapta y engancha perfectamente el pene del verraco al girar hacia la izquierda, ya que tiene forma de tirabuzón.

4.2. Pubertad

En la cerda, el período pre-púber es una fase poco estudiada, pero como en la mayoría de los mamíferos, el funcionamiento de los órganos que actúan, ovario y complejo hipotálamo-hipofisiario, empieza en la vida fetal.

Se ha demostrado que existen descargas pulsátiles de la hormona gonadotropina LH desde las primeras semanas de vida. La presencia de estas pulsaciones indica una preparación evidente de la pubertad desde el segundo mes de vida.

El término pubertad se utiliza para definir el inicio de la vida reproductiva. En la hembra, la pubertad está asociada, generalmente, con la primera aparición del estro y la ovulación. En la cerda, la pubertad coincide con el comienzo de la capacidad reproductiva, puesto que la primera ovulación va acompañada por la receptividad sexual.

El control del inicio de la pubertad se realiza por procesos neuroendocrinos. La regulación endocrina del inicio de la pubertad implica un cambio en la frecuencia del pulso de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que controla el patrón de secreción de la hormona luteinizante (LH) desde la hipófisis anterior.

Normalmente, la pubertad se presenta en las cerdas alrededor de los 160-190 días de edad, con un peso corporal aproximado de 100 Kg. Hay diversos factores que pueden tener un efecto estimulante o inhibitorio sobre la llegada de la pubertad. Estos factores se agrupan en:

a) Genéticos.

- La raza y, dentro de ella de las diferentes líneas.
- Efecto de heterosis en los cruzamientos.

b) Ambientales.

- Alojamiento: Las cerdas criadas individualmente son púberes aproximadamente 15 días más tarde que las criadas en grupo.
- Ambiente: Las cuadras sucias o con fosas llenas tienen efecto negativo sobre el inicio de la pubertad, debido principalmente a las altas concentraciones de gases que interfieren con la feromona del macho.
- Presencia del macho: Este factor es importante en el caso de hembras aisladas, resultando eficaz después del estrés del transporte. Interesa el contacto con el verraco, a través de su hormona, feromona 3-androstenol. El efecto dependerá además de la libido que muestre el verraco.
- Estrés del transporte, conocido por los ganaderos, por su efecto sobre la hembra ya púber.
- Edad, peso vivo, nutrición y tasa de crecimiento: Existe una estrecha relación con el consumo energético, altos niveles permiten la aparición temprana de la pubertad.
- Estimulación con hormonas exógenas: mediante tratamientos gonadotrópicos o estrogénicos.
- Estación de nacimiento: Hay resultados contradictorios al respecto, y se considera que la presencia del macho anula este factor.

El conocimiento de estos factores ha permitido utilizar diferentes técnicas de manejo para estimular la llegada de la pubertad. Se utiliza a menudo la exposición a machos maduros, la mezcla con hembras multíparas, o la ubicación en entornos nuevos. Los estímulos son más efectivos en cerdas de aproximadamente 180 días de edad. En hembras que se mantienen aisladas, con días de corta duración o con temperaturas altas, la pubertad suele retrasarse. En consecuencia, la pubertad puede aparecer con una gran dispersión dependiendo de las condiciones de manejo y ambientales, tanto en cerdas jóvenes de 135 días, hasta 250 días o más.

4.3. CICLO SEXUAL

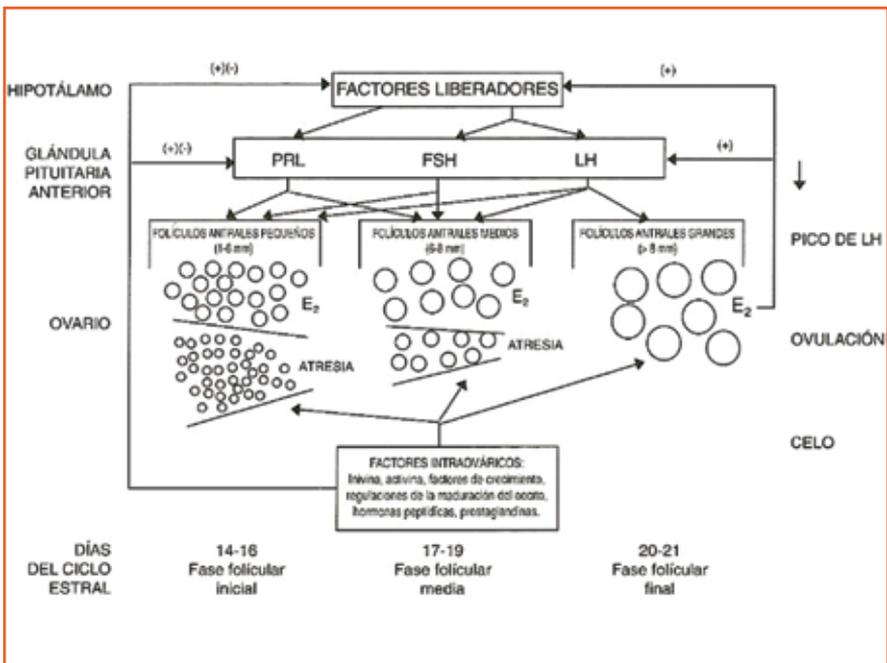
En la cerda el ciclo sexual tiene una duración promedio de 21 días. Comprende dos fases: folicular y luteal.

Fase folicular

La fase folicular dura desde el término de la luteolisis e inicio del crecimiento folicular (día 14-16) hasta la ovulación y formación posterior de nuevos cuerpos lúteos.

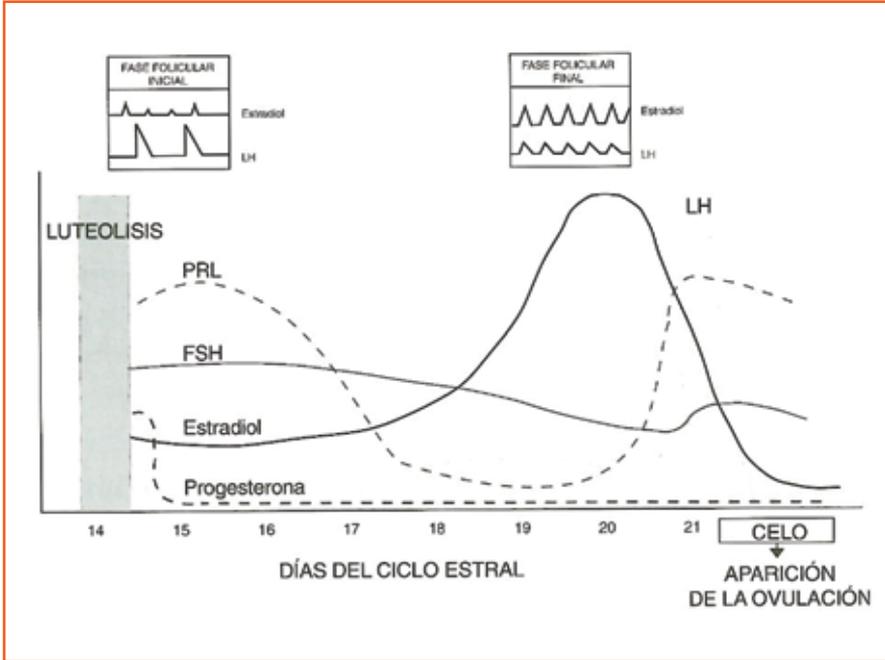
Los folículos proceden del conjunto proliferativo. Su crecimiento es continuo si no hay atresia, hasta alcanzar un diámetro >6mm, momento en que pueden seguir dos vías: la ovulación o la atresia. Se sabe que sólo unos pocos folículos, alrededor del 25% de los que empiezan su crecimiento alcanzan el tamaño pre-ovulatorio y maduran. Se ha sugerido que aquellos más grandes y los que producen más estrógenos durante la selección son los que ovularán, mientras que los más pequeños y los menos activos estrogénicamente se transformarán en atrésicos.

Los principales reguladores del desarrollo folicular son por un lado la hormona folículo estimulante (FSH) y por otro la luteinizante (LH) que estimula la madurez; además de los estrógenos, el 17- β estradiol (E₂) facilita la acción de las gonadotropinas y la prolactina (PRL) ejerce un efecto modulador. En el ganado porcino, los estrógenos secretados por los folículos dominantes estimulan la maduración de los folículos más pequeños jerárquicamente. Los folículos ovulatorios pueden variar de tamaño, pero oscilan alrededor de los 2 mm de diámetro y mostrar marcadas diferencias estructurales y bioquímicas. Esta heterogeneidad se produce también dentro del conjunto ovulatorio, como consecuencia, se produce una asincronía en la maduración de los oocitos, observándose grandes diferencias en el desarrollo embrionario del los cerdos.



Regulación hormonal de la fase folicular

En la figura siguiente se representa esquemáticamente las concentraciones de las hormonas en sangre durante la fase folicular.



LH- β estradiol (E2): Durante las etapas foliculares media y tardía, el 90% de los pulsos están asociados temporalmente con los pulsos de FSH y, sin embargo, el contenido de todos los esteroides en el fluido folicular disminuyen significativamente en la ovulación.

LH: La frecuencia de los pulsos aumenta desde 1,1 a 2,5/6 horas en la etapa folicular temprana hasta 2,5 a 6 horas; simultáneamente la amplitud disminuye desde 2 ng/ml hasta 0,9 ng/ml. Durante la etapa folicular media y tardía el 93-100% de los pulsos de LH están asociados con los pulsos de FSH. El aumento de la secreción de E2 por los folículos en crecimiento estimula el pico de LH pre-ovulatorio, que puede ocurrir desde las 7 hasta las 8 horas después de la concentración máxima de estrógeno pre-ovulatorio. El pico de LH dura aproximadamente 20 horas, se ha demostrado que la estrecha relación entre el comienzo del pico, el comportamiento estral y el pico de E2 pueden estar asociados con la fertilización y el aumento de la supervivencia embrionaria antes de la implantación.

FSH: La concentración media de FSH, disminuye coincidiendo con el aumento de la concentración de E2. En la cerda aparece un pequeño pico de FSH sólo en el momento del pico pre-ovulatorio de LH. Su secreción está controlada por la inhibina, péptido ovárico, mientras que la gr. tiene un papel menor en la

regulación de la liberación de FSH. La inhibina, producida en concentraciones crecientes por los folículos en crecimiento inhibe la secreción de FSH durante la etapa folicular temprana hasta la tardía.

PRL: Se han observado dos picos de PRL durante la fase folicular porcina, el primero de ellos empieza 4 ó 5 días antes de la aparición del celo, y el segundo alrededor del día 1, antes del pico pre-ovulatorio del LH y dura 3 días.

En las cerdas, la destrucción de los folículos durante la fase folicular produce anovulación y degeneración ovárica quística. Es evidente que el prolongado estrés eleva las concentraciones plasmáticas de los glucocorticoides, que son la causa directa de la degeneración ovárica quística.

Fase luteal

La fase luteal se caracteriza por la presencia del cuerpo lúteo, que es una mini-glándula endocrina, desarrollada a partir de la pared folicular después de la ovulación. Las células de la granulosa se hipertrofian, un pigmento carotenoi-de, luteína, da el color amarillo al cuerpo lúteo en rumiantes. En las cerdas el cuerpo lúteo tiene un color rosa rojizo. El cuerpo lúteo secreta principalmente progesterona. El comienzo de la función del cuerpo lúteo en las cerdas y su capacidad esteroidogénica dependen básicamente de la LH.

La secreción de LH durante la fase luteal del ciclo estral de las cerdas puede ser dividida en tres períodos: temprano (día 2-8), medio (día 9-12) y tardío (día 13-15). La vida media del cuerpo lúteo en la cerda es de alrededor de 14 días. Durante el período temprano la concentración de LH en sangre es baja y constante (1,4 ng/ml), el período intermedio se caracteriza por variaciones considerables de LH (0,5-5 ng/ml), y el tercero por la disminución del nivel de LH (0,5-1 ng/ml). Durante el período intermedio de LH se libera en pulsos cortos (75 min. De duración) de gran amplitud (50% del pico pre-ovulatorio) cada 2-3 horas. La alta concentración de LH durante el período intermedio de la fase luteal en las cerdas, puede estar relacionada con la demanda de su tejido luteal-cuerpo lúteo entre los días 6 y 12 del ciclo estral. El carácter pulsátil de los cambios de LH en sangre está, probablemente, relacionado con la selección de folículos ováricos que, en parte sufren atresia, pero el resto se desarrolla y madura.

4.4. INDUCCIÓN Y CONTROL DEL CICLO ESTRAL

La forma natural más efectiva de inducción del celo en hembras prepubernales es el contacto con machos adultos. De acuerdo con la experiencia de KUBUS, las nulíparas pueden ser estimuladas por contacto con el macho desde la temprana edad de 150 días y 80-85 kg de peso vivo. De media, la estimulación de hembras algo mayores, con 170 días de vida, provoca la aparición del celo a los 7 días después del inicio del contacto.

Sin embargo, para optimizar el número de lechones destetados por cerda y año y reducir el número de días no productivos, diferentes hormonas naturales o sintéticas pueden ser usadas en el control del celo y la ovulación.

En reproducción porcina se usan tanto progestagénos como gonadotropinas. Entre las gonadotropinas más frecuentemente usadas encontramos la PMSG (Gonadotropina sérica de yegua gestante) y la HCG (Gonadotropina coriónica humana). La PMSG es biológicamente similar a la FSH y LH (70% de actividad FSH y 30 % de actividad LH) y la HCG es un agonista natural de la LH. Durante muchos años la combinación de 400 UI de PMSG y 200 de UI de HCG ha demostrado ser efectiva y más fácil de aplicar que 2 inyecciones seguidas de PMSG y HCG.

La combinación PMSG/HCG puede ser usada para inducción de celos fértiles en hembras prepúberes de una edad de 5,5 – 7 meses. Una inyección intramuscular de esta combinación induce el celo en la mayoría de las hembras tratadas en los 7 días siguientes a la inyección. El mejor método para la sincronización de hembras púberes es la aplicación oral de altrenogest, agonista de la progesterona. Las núlparas deben ser alimentadas individualmente con 15 – 20 mg de altrenogest durante un periodo de tiempo de 15 a 18 días. El celo aparece en el 90 % de las hembras tratadas a los 4 – 7 días del fin del tratamiento, pudiendo ser inseminadas 2 veces en un intervalo de 24 horas comenzando 6–12 horas después del inicio del celo. La combinación de 400 UI de PMSG y 200 de UI de HCG puede también ser usada para la sincronización del celo en hembras destetadas. Las gonadotropinas deberían aplicarse subcutáneamente o intramuscularmente detrás de la oreja el día siguiente al destete (0 – 2 días). El uso de gonadotropinas induce el celo a los 4–6 días post-tratamiento.

05

Detección de celo



Swine Artificial Insemination
KUBUS S.A.
Inseminación Artificial Porcina

Es uno de los factores más importantes para la realización con éxito de la inseminación artificial. De acuerdo al momento de aparición de celo, determinaremos el momento adecuado para realizar la inseminación artificial. Para la detección de celo en la cerda se pueden usar diversos métodos que varían en cuanto su exactitud:

1. Observación de signos externos

- Edema e hipertermia vulvar
- Secreción vaginal abundante y espesa
- Actitud inquieta y pérdida del apetito
- Orejas erectas
- Gruñidos característicos
- Orinan con frecuencia



Signos externos de celo



Signos externos de celo

2. Observación del comportamiento sexual

- Búsqueda del verraco
- Montan y se dejan montar por otras hembras
- Reflejo de inmovilidad

Desencadenamiento del reflejo de inmovilidad

- Por el verraco:
 - Pasando el verraco por las jaulas
 - Pasando el verraco por los parques
 - Pasando la hembra por la verraquera



Detección de celo por el pasillo

- Por el hombre (presión sobre los lomos)



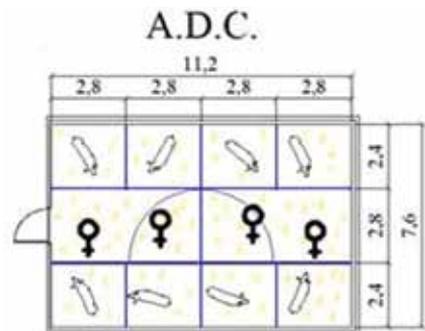
Desencadenando el reflejo de inmovilidad

- Por estímulos simuladores del verraco:
 - Aerosoles con feromonas
 - Peso de las mochilas

Área de Detección de Celo: ADC

- Local cerrado de concentración de machos.
- Proporciona mayor oferta sexual.
- Mayor concentración de olor y feromonas.
- Mayor estimulación de la hembra.
- Permite inseminar en el momento de mayor aceptación, evitando los periodos refractarios.
- Son necesarios 2-3 machos por cerda en recela, trabajando en grupos de 3 en 3 hembras.

Es conveniente realizar la detección de celo dos veces al día para concretar con mayor seguridad el momento de inicio del celo y consecuentemente el momento más indicado para realizar la inseminación artificial, siendo recomendable distanciar en lo posible el intervalo entre la primera y segunda detección del celo, esto significa que la primera recela deberá efectuarse a primera hora por la mañana y la segunda a última hora de la tarde. De todas formas, si no es posible realizar 2 detecciones de celo al día



Vista real de un cuadrado de la cámara de Bürker (3 esperm.)

de forma correcta, es mejor realizar una sola, pero correctamente.

La detección de celo se debe mantener hasta el final del mismo; es tan importante detectar el inicio como el final del celo, y en ocasiones necesario para detectar la causa de un proceso de disminución de la fertilidad y sobre todo del tamaño de camada.

Con las cerdas destetadas habría que iniciar el contacto con el verraco inmediatamente después del destete, ya que esta práctica no está sólo encaminada a descubrirnos las cerdas en celo, sino también a estimular a las hembras para que salgan en celo.

Con las nulíparas se obtiene mejor respuesta cuando el macho visita la celda de las hembras y éstas están alojadas en grupos no muy numerosos de 6 -8 hembras. Además, es conveniente que el macho no esté alojado en la misma nave de las hembras, ya que de esta forma hay un "efecto sorpresa" que produce un mayor estímulo en las nulíparas. Sin embargo, para las hembras destetadas funciona mejor si la hembra visita el corral del macho de una en una, estando el macho alojado en frente de la zona donde se ubican las hembras destetadas, de forma que éstas puedan oír, ver y oler al macho constantemente.

Sea cual sea el sistema de recela es importante que permita el contacto nariz-nariz entre hembra y macho.

Las características de los machos recela deben ser las siguientes:

- Machos adultos productores de saliva con alta concentración de feromonas: 1 ó varios según tamaño de la granja, (1 macho / 100-150 hembras en producción).
- Machos con fuerte olor sexual, buena libido, no agresivo y fácil de manejar.
- De tamaño adecuado al de las hembras que vamos a recelar: Esto es de vital importancia con las nulíparas.
- Vasectomizado o epididectomizado.

06

Momento adecuado para la aplicación de dosis



Swine Artificial Insemination
KUBUS S.A.
Inseminación Artificial Porcina

La determinación del momento más adecuado para realizar la IA, radica en ajustar los tiempos en que se produce la ovulación y el momento de inicio del celo.

La ovulación se produce entre las 30-70 horas del pico preovulatorio de LH. Si el momento de esta descarga preovulatoria (y por tanto de la ovulación), no muestra una estrecha relación con la aparición de los síntomas de celo, puede descender el porcentaje de fertilidad y prolificidad, debido a que las cubriciones no se llevan a cabo en el momento adecuado.

La máxima ovulación se produce entre las 36 y 44 horas después del inicio de la inmovilización, habiendo poca ovulación en las primeras 24 horas.

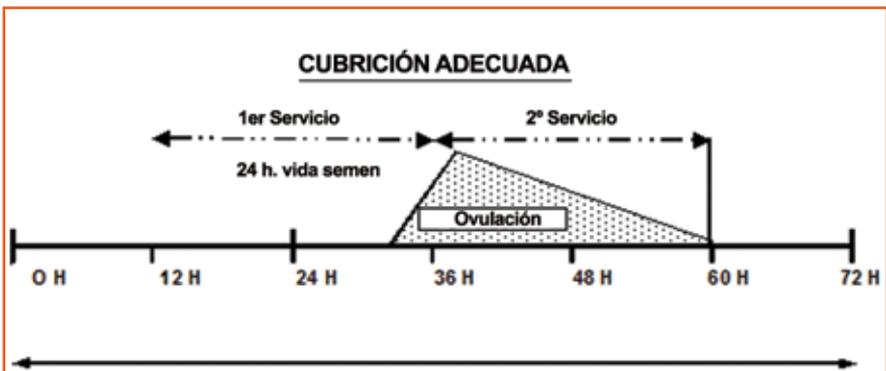
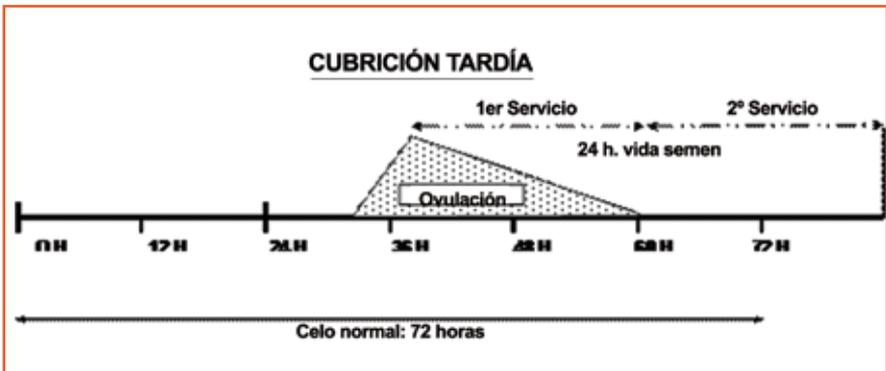
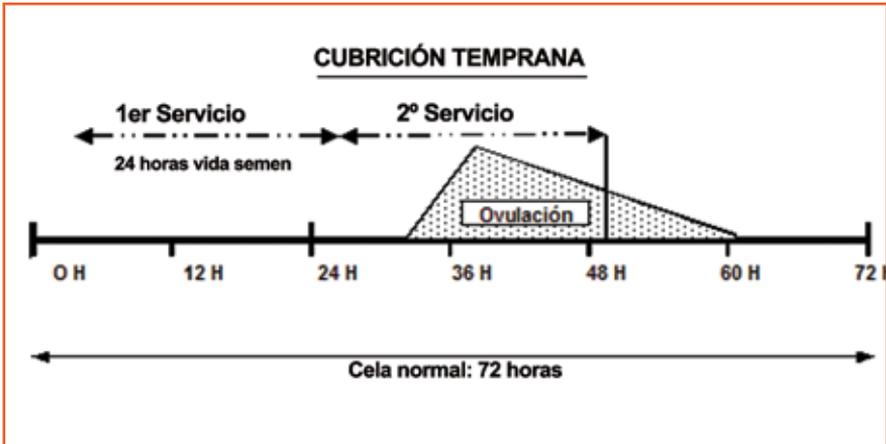
En general la aplicación de la dosis seminal debe estar próxima al último tercio de la duración del celo, momento más próximo a la ovulación. La vida media de un óvulo es de 10 a 20 horas, aunque un óvulo se considera que está envejecido cuando tiene más de 8 horas, por esto, el contacto entre el óvulo y los espermatozoides debe ser anterior a las 8 horas de vida del óvulo.

Si se realizan dos detecciones de celo al día, podemos retrasar la 1ª I.A. a la mañana o tarde siguiente (según sea el caso) de la detección de celo, y sucesivas inseminaciones cada 24 horas.

Dado que la supervivencia de los espermatozoides dentro del tracto genital de la hembra es de 22 – 24 horas, debemos intentar que la separación entre dos inseminaciones consecutivas sea, al menos, de 10 – 12 horas, si no su efectividad se ve reducida ya que estamos superponiendo una sobre otra.

Realizar cubriciones antes de las 6 primeras horas desde que la cerda comenzó la inmovilización puede resultar en un tamaño menor de camada, dado que esta cubrición podría no ser efectiva en el periodo de máxima ovulación. En el otro extremo, realizar la cubrición demasiado tarde en el segundo día del reflejo de inmovilidad podría no solamente aumentar la dificultad en cubrir a una cerda que ha perdido la fase de estro, sino que también se puede haber perdido la viabilidad de los óvulos lanzados en estadios precedentes, además de existir la posibilidad de generar descargas vaginales.

En general, en una explotación porcina alrededor del 70% de todas las hembras tienen celos normales con una duración de 48-72 horas, habiendo otro 20% que presentan celos anormalmente cortos, de menos de 40 horas y un tercer grupo de hembras, el 10% que presentan celos anormalmente alargados de más de 72 horas. Por lógica, cada grupo de hembras necesitará un protocolo de inseminación diferente.



Situaciones para determinar el momento adecuado de la inseminación

Nulíparas

Inseminación artificial para nulíparas con dos inseminaciones

	Día 1	Día 2	Día 3
MAÑANA	1ª I.A.	2ª I.A.	-----
TARDE	-----	-----	-----

Inseminación artificial para nulíparas con tres inseminaciones.

	Día 1	Día 2	Día 3
MAÑANA	1ª I.A.	3ª I.A.	-----
TARDE	2ª I.A.	-----	-----

Multíparas

El mejor método para predecir la duración del celo es tener en cuenta el intervalo destete - salida a celo:

A) Hembras que ciclan entre 4 y 7 días post-destete

Este grupo de hembras, aproximadamente el 70 % de todas las hembras de una granja, presentan celos de una duración normal de 48 - 72 horas. Aquí encontramos dos protocolos distintos en función de si se recela una o dos veces al día.

UNA detección de celo al día: Con dificultad para el manejo reproductivo por la tarde.

En un caso práctico, si realizamos la detección de celo sólo por las mañanas y existe en la explotación dificultad para el manejo reproductivo por la tarde, la 1ª I.A. la haremos esa misma mañana, y la 2ª I.A., a la mañana siguiente.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
MAÑANA	CELO 1ª I.A.	CELO 1ª I.A.	CELO 1ª I.A.	Si hay celo, no inseminar
TARDE	-----	-----	-----	-----

DOS detecciones de celo al día:

Si realizamos la detección de celo dos veces al día, una cerda que esté en celo por la mañana la inseminaremos por primera vez esa tarde, y la 2ª inseminación a la mañana siguiente. Si demuestra el celo por la tarde, haremos la 1ª I.A. a la mañana siguiente y la 2ª I.A. 12 horas después de la 1ª inseminación.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
MAÑANA	CELO	CELO 2ª I.A.	Si hay celo 3ª I.A.	Si hay celo, no inseminar
TARDE	1ª I.A.	-----	-----	-----

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
MAÑANA	-----	CELO 1ª I.A.	Si hay celo 3ª I.A.	Si hay celo, no inseminar
TARDE	CELO	2ª I.A.	-----	-----

B) Hembras que ciclan con menos de 4 días post-destete

La mayoría de las cerdas que salen en celo el 3º y 4º día después del destete son las que se mantienen en celo durante un período de tiempo más prolongado, celos de más de 72 horas, por lo que normalmente no se inseminan el primer día de celo, empezando el segundo día por la mañana y repitiendo cada doce horas. Conviene prestarles mayor atención en la detección del tercer día de celo inseminándolas nuevamente por la mañana, siempre y cuando la manifestación del celo sea clara.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
MAÑANA	CELO	CELO 1ª I.A.	Si hay celo 3ª I.A.	Si hay celo, no inseminar
TARDE	CELO	2ª I.A.	-----	-----

C) Hembras que ciclan después del 7º día post-destete

Contrariamente, aquellas cerdas que retrasan su salida en celo más de 7 días después del destete, suelen tener una duración de celo menor, de menos de 40 horas y con ovulaciones tempranas, por lo que conviene prestar mayor atención a las dos primeras inseminaciones.

	Día 1	Día 2	Día 3
MAÑANA	1ª I.A.	3ª I.A.	-----
TARDE	2ª I.A.	-----	-----

Aplicación del semen

07



Swine Artificial Insemination
KUBUS S.A.
Inseminación Artificial Porcina

7.1. INTRODUCCIÓN DEL CATÉTER.

Siempre, el primer paso de este proceso es la limpieza de los labios de la vulva con una toallita impregnada en un desinfectante no espermicida. No es recomendable usar agua o esponjas ni la limpieza únicamente con papel. Posteriormente hay que lubricar la punta del catéter con un gel lubricante no espermicida.



Limpieza de la vulva



Introducción correcta del catéter

En la base de la vagina, se encuentra el orificio uretral, por lo que a la hora de inseminar, tendremos que introducir el catéter inclinado señalando al techo de la vagina en un ángulo de 45°, para no introducirlo por la uretra, en cuyo caso, saldría orina por el catéter y lo desecharíamos. Una vez salvado el orificio, colocamos el catéter horizontalmente y lo introducimos realizando giros hacia la izquierda si utilizamos un catéter de espiral, hasta que quede enganchado en el cuello del útero, lo que comprobamos tirando ligeramente hacia fuera. Una vez fijo el catéter se introduce la dosis seminal lentamente, debiendo tardar entre 3-5 minutos en ello. Una vez finalizada la introducción de la dosis seminal es recomendable retirar el envase vacío, tapar el catéter y dejarlo unos minutos para incrementar la estimulación de la hembra y facilitar el progreso de los espermatozoides dentro del tracto genital de la hembra.

7.2. MÉTODO DE INSEMINACIÓN CONVENCIONAL O TRADICIONAL

La aplicación del semen tiene que simular en lo posible, la monta natural del verraco, así se ha demostrado que la estimulación del cérvix ayuda de alguna forma la descarga preovulatoria de la hormona luteinizante (LH), ayudando a que se produzca en menos tiempo la ovulación, lo cual es importante a la hora del porcentaje de fertilidad final. Por esta razón, es conveniente introducir el catéter de inseminación y dejarlo puesto 2-3 minutos antes de la aplicación del semen que ha de introducirse lentamente de 3 a 5 minutos.

Hay que tener en cuenta que en la monta natural, la última fracción del eyaculado, está constituida por el gel o tapioca, cuya misión es formar un tapón en el cuello del útero y así evitar el reflujo del semen. En la I.A., al no haber tapioca, es necesario introducir el semen lentamente y evitar así que refluya

parte de la dosis. De igual forma, al ser 37°C la temperatura corporal, si antes de la dosis seminal introducimos unos 10 ml. de diluyente solo a 42°C (inseminación bifásica), provocamos una estimulación de las contracciones uterinas cuyo resultado es la mejor aceptación del semen cuando inseminamos a 37°C. Todo esto también se favorece si la inseminación la realizamos en presencia de un verraco, para así ayudar a la estimulación de la cerda.

Fases de aplicación

1.- Técnica rápida:

- Introducción del catéter.
- Aplicación de la dosis seminal a 37°C, durante 2-3 minutos. Esta misma técnica puede ser usada en frío, con el semen únicamente atemperado a temperatura ambiente.

2.- Técnica lenta (estímulo del aparato genital):

- Introducción del catéter (mantener 2 minutos).
- Introducción de 10 cc de diluyente a 42°C (estimulación de contracciones).
- Introducción de dosis seminales a 35 - 37°C durante 5 minutos.
- Introducción de 25-30 cc de diluyente a 42°C (estimulación de contracciones). En la técnica bifásica de inseminación este punto no se realiza.

La técnica lenta permite mejorar los resultados de fertilidad y prolificidad, particularmente cuando el momento de la inseminación es el idóneo.

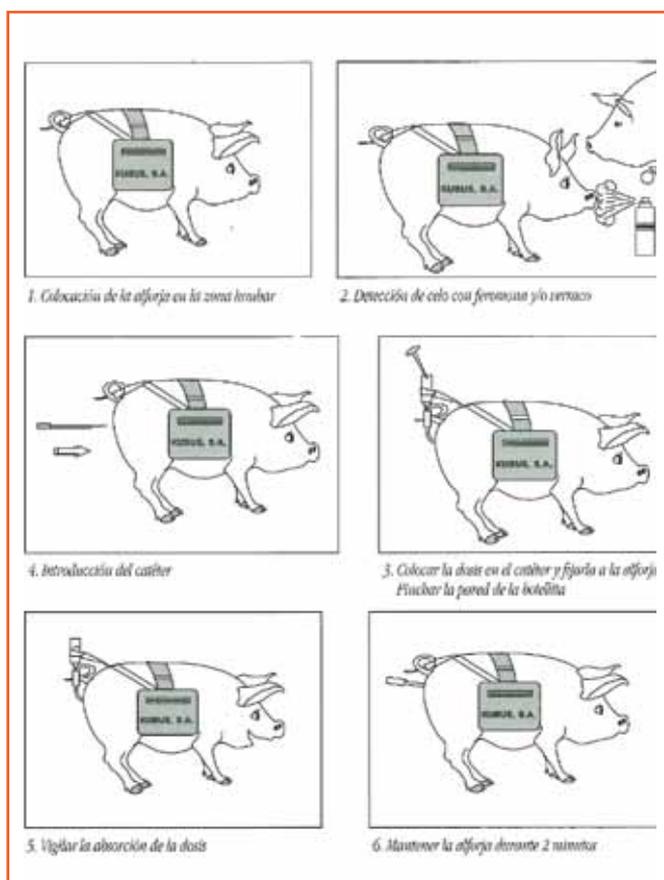
7.3. MÉTODO DE INSEMINACIÓN "MANOS LIBRES"

Uno de los pasos difíciles de realizar con corrección durante la I.A. es la aplicación del semen.

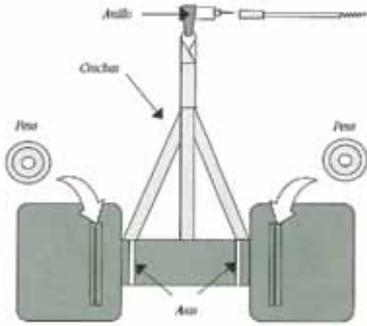
A la hora de realizar la I.A. es muy importante el estímulo sexual de la cerda durante la aplicación del semen. El método de aplicación con este sistema consiste en:

- Colocar la alforja en la zona lumbar. El peso de la alforja de inseminación manos libres es de 8-10 kg. de peso para las cerdas nulíparas y 12-14 kg. para las múltiparas. El diseño de la alforja de inseminación aparece en el esquema 1.
- Aplicación de feromona delante del hocico de la cerda o inseminar en presencia del verraco.
- Limpiar los labios de la vulva.
- Lubricar el catéter.
- Introducir el catéter.

- En el caso de cerdas nulíparas introducir por presión 30cc de PREDIL MR-A® a 35°C.
- Enganchar el depósito de la dosis seminal a 35°C en el catéter.
- Sujetar la dosis seminal a la cincha.
- Pinchar la pared del depósito que contiene la dosis seminal.
- Vigilar la absorción de la dosis mientras se coloca la alforja a las cerdas siguientes.
- Al terminar la absorción se quita el catéter o bien se deja puesto, impidiendo la entrada de aire. Mantener la alforja sobre la cerda durante 2 minutos.
- Quitar la alforja.



Introducción correcta del catéter



Diseño de la alforja de inseminación "manos libres"



Cerda ibérica inseminada con la técnica "Manos Libres"

Tabla 1. Respuesta individual de 15 cerdas nulíparas durante la I.A. "manos libres"

Nº	Reflejo de inmovilización	Tiempo de absorción	Reflujo
1	+	4'35''	no
2	+	4'00''	no
3	+	3'30''	< 20cc
4	+++	1'40''	no
5	++	2'45''	no
6	++	1'40''	no
7	++	2'30''	no
8	++	2'30''	no
9	++	3'00''	no
10	+	4'00''	no
11	+++	10'30''	no
12	++	2'30''	no
13	+	3'20''	no
14	++	2'00''	no
15	+++	10'00''	no

Tabla 2. Resultados de fertilidad y prolificidad con I.A. "manos libres"

Método de I.A.	Nº de I.A.	Tasa de partos	% Fertilidad	Nacidos vivos
Manos libres	160	134	83.75	10.8
Operario	160	129	80.60	10.5

7.4. MÉTODO DE INSEMINACIÓN POST-CERVICAL

En los últimos años se ha popularizado la técnica de inseminación post-cervical como método para mejorar la eficiencia reproductiva y el progreso genético. Esta técnica consiste en depositar el semen en el cuerpo del útero mediante la utilización de una cánula que discurre por el interior del catéter y que cuando el cervix se abre completamente es posible introducirla hasta el mismo cuerpo del útero.

En este tipo de inseminación se utiliza un volumen y concentración de dosis reducidos. Aunque en algunos casos se utilizan menores, es aconsejable no bajar de 40 – 45 cc de volumen de dosis y 1.500 x 10⁶ espermatozoides viables y nunca "partir" dosis, sino utilizar dosis específicamente preparadas para inseminación post-cervical.

Cuando se utiliza este tipo de técnica hay que prestar especial atención a la calidad seminal, ya que cuanto menor es la concentración de espermatozoides usada, mayor necesidad tenemos de una mejor calidad seminal. De hecho, algunos fracasos que se han producido en algunas granjas cuando se ha empezado a utilizar esta técnica han sido debidos a problemas con la calidad seminal más que con defectos de la propia técnica de inseminación.

Fases de aplicación

- 1. Limpiar bien los labios de la vulva con una toallita desechable impregnada en desinfectante no espermicida.
- 2. Sacar el catéter de su funda individual de plástico sin tocar el extremo anterior ni la punta de la cánula.
- 3. Romper la funda individual de plástico presionando desde el interior hasta que la parte de espuma o espiral quede fuera de la bolsa de plástico.
- 4. Lubrificar la punta del catéter con gel lubricante no espermicida.
- 5. Introducir el catéter de forma habitual sin que la cánula interior se exteriorice.
- 6. Fijar el catéter en el cervix de la cerda.
- 7. Introducir la cánula interior hasta que notemos la primera resistencia de los pliegues cervicales.
- 8. Introducir 15 – 25 cc. de Predil® calentado a 38 – 42°C.
- 9. Esperar unos segundos para que la cerda se relaje antes de iniciar la introducción de la cánula.
- 10. Iniciar la introducción de la cánula cogiéndola suavemente con los dedos pulgar e índice y haciendo una leve presión hacia el interior para superar las pequeñas resistencias de los anillos cervicales. Continuar con este proceso

- hasta alcanzar el cuerpo del útero.
- 11. Introducir la dosis seminal a temperatura ambiente de una sola vez: 30–45 cc. y una concentración de 1.000–1.500 millones de espermatozoides.
 - 12. Si la operación se ha realizado correctamente, comprobar que no hay reflujos.
 - 13. Retirar la cánula interior dejando el catéter dentro de la cerda durante 3–5 minutos.
 - 14. Quitar el catéter de forma habitual.



Introducción de la sonda intrauterina

Uso de plasma seminal sintético en cerdas nulíparas

08



Swine Artificial Insemination
KUBUS S.A.
Inseminación Artificial Porcina

INTRODUCCIÓN

Con el uso de las técnicas de I.A. en lugar de la monta natural se elimina el uso del verraco y se reducen muchos de los estímulos asociados con la cubrición, que influyen en la actividad fisiológica de la hembra, necesarios para lograr una buena fertilidad. Además, se reduce considerablemente el volumen de plasma seminal por cerda, debido al gran número de dosis producidas por eyaculado.

Por ello se consideran necesarios otros componentes del proceso de monta natural para optimizar los resultados de tasa de parto y tamaño de camada.

El manejo de las nulíparas de reemplazo y su adaptación en el hato productivo es una de las actividades más importantes en una explotación porcina. Muy a menudo, el tamaño de la camada al primer parto es inferior al de la cerda adulta y puesto que la tasa de reemplazo por año es alrededor del 40 al 50% del hato de hembras, es necesario maximizar la eficiencia reproductiva de las primerizas lograda con la IA.

El conocimiento adquirido en relación con la sensibilización en el tracto genital de la hembra ha permitido establecer técnicas para tratar de incrementar el porcentaje de fertilidad, disminuir la mortalidad embrionaria y mejorar el tamaño de camada.

Se ha comprobado que el pre-tratamiento con plasma seminal antes de la inseminación mejora la tasa de fertilización, lo que puede deberse a un incremento de la concentración espermática en el istmo del oviducto motivado por el aumento de las contracciones uterinas y debido al efecto de relajación en el istmo por el plasma seminal (dilatando la unión útero-tubárica), aumentándose así el transporte espermático hacia el oviducto.

El plasma seminal parece ejercer varios grados de actividad inmunosupresora en la hembra mejorando la protección de los espermatozoides y de los embriones en fases precoces de pre-implantación.

El plasma seminal induce a una respuesta inflamatoria aguda en el endometrio provocando cambios en el tejido endometrial, que son benéficos en la preparación del útero para la implantación y pueden contribuir al éxito del establecimiento de la gestación.

La importancia del plasma seminal es que en su composición hay diferentes componentes que tienen efectos importantes sobre el espermatozoide, tracto reproductivo de la hembra (útero y oviducto) y en la supervivencia e implantación embrionarias que se resumen a continuación:

Efectos del plasma seminal:

- Medio de transporte para espermatozoides:
 1. Efecto sobre el metabolismo espermático.
 2. Efecto sobre la motilidad espermática.
- Cambios en la fisiología uterina:
 1. Estimulación de las contracciones uterinas.
 2. Efecto de relajación en el istmo del oviducto.
 3. Respuesta inflamatoria del endometrio.
 4. Adelanto de la ovulación.
 5. Actividad antimicrobiana.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un plasma seminal sintético (PSS) basado en la composición del plasma seminal.

De acuerdo a nuestra experiencia práctica las técnicas de utilización del PSS en cerdas nulíparas son las siguientes:

1.- Uso de P.S.S. en cerdas nulíparas con el método de inseminación bifásica.

Este método consiste en administrar un volumen de 30 cc. de PSS atemperado a 37°C (misma temperatura que la dosis) previamente a la aplicación de las dosis seminales, siguiendo la pauta de IA para nulíparas.

Tratamiento	Nº de Nulíparas	Porcentaje de No Retorno (%)	Porcentaje de Fertilidad a Parto (%)	Tamaño de camada (nacidos vivos)
A-Control	225	84.4	81.3	9.84
B-PSS	174	90.2	85.6	10.03

Martín Rillo, S. y col., 1996

2.- Sensibilización de cerdas nulíparas con P.S.S. en el ciclo estral previo a la inseminación.

Este método consiste en administrar un volumen de 100 cc de PSS a 37°C durante el celo previo al que se vayan a inseminar las cerdas nulíparas; para en el celo siguiente inseminar siguiendo la pauta de IA para nulíparas, es decir, 30 cc de PSS previamente a la introducción de la dosis en cada una de las inseminaciones que se hagan en ese celo.

Resultados

Grupo	Nº de Nulíparas	% N.R. (5 sem)	% de Partos	LNT	LNV	LNT / 100 I.A.	LNV / 100 I.A.
A-PSS	145	92.15	88.10	10.86	10.24	957	902
B-Control	325	85.32	79.72	10.28	9.38	820	748

NR- Tasa de no retorno

LNT- Lechones nacidos totales

LNV- Lechones nacidos vivos

09

Manejo de la cerda inseminada y diagnóstico precoz de gestación



Swine Artificial Insemination
KUBUS S.A.
Inseminación Artificial Porcina

La hembra una vez inseminada debe mantenerse en la zona de cubrición-control por un periodo ideal de 35 a 42 días, durante este periodo la hembra no deberá sufrir ningún manejo o reagrupamiento que le pueda provocar stress y que le ocasione una posible reabsorción o pérdida embrionaria. Especialmente crítico dentro de este periodo es la segunda semana post-cubrición que coincide con la fecha de implantación de los embriones al endometrio.

A partir de quince días post-cubrición se llevarán a cabo los controles de vuelta a celo y confirmación del diagnóstico de gestación:

El control de vuelta a celo se deberá efectuar con la ayuda de verracos recelas, debiendo pasarse al verraco recela por delante de las cerdas dos veces al día durante 15 minutos cada vez como mínimo, bajo la atenta vigilancia del operario, siempre a las mismas horas y sin coincidir con las comidas u otros momentos en que los animales u operario puedan distraerse.

Durante la recela se prestará especial atención a las cerdas que se encuentren entre los 18 y 24 días post-cubrición que es el periodo cuando puede ocurrir la mayor frecuencia de vueltas a celo de tipo regular y que es cuando han de detectarse.

Las cerdas vueltas a celo o negativas pasarán a la zona de cubrición para volver a inseminarse o se eliminarán según sus antecedentes reproductivos.

Las cerdas que no vuelvan a celo o positivas después de este control, deberán confirmarse posteriormente con alguno de los métodos de diagnóstico de gestación disponibles:

- A partir del día 22 post-cubrición si es con un aparato de ultrasonografía tipo B (ecógrafo de pantalla), en donde se observarán las vesículas embrionarias si la hembra está gestante.
- Entre los días 28 y 35 si es con un aparato de ultrasonografía tipo A (ultrasonidos) en donde se observa una luz y/o se escuchará el sonido de positividad, o con un equipo de efecto Doppler en donde se escuchará la actividad de la arteria uterina en la hembra gestante o los latidos de los corazones fetales en el segundo control.

Posteriormente se volverá a comprobar entre los 35 y 42 días post-cubrición con cualquiera de los métodos de diagnóstico disponibles, considerándose como gestante a toda hembra que resulte positiva durante el diagnóstico y trasladándose a estas hembras a la zona de gestación confirmada dentro de la explotación.

Manejo de la cerda gestante

Tres son los objetivos principales en el manejo de la cerda gestante: llegar al parto con una correcta condición corporal, mantener la gestación maximizando el tamaño de la camada (evitar en lo posible la mortalidad embrionaria) y con-

seguir un peso adecuado y uniforme de los lechones. Para alcanzarlos habrá que tener en cuenta el manejo de la cerda durante la fase embrionaria de la gestación (primeros 35 días) y el manejo que se haga de su alimentación.

Manejo de la cerda

El someter a estrés las cerdas o primerizas durante la fase embrionaria puede desembocar en un aumento de la mortalidad embrionaria que producirá una reducción del tamaño de la camada o incluso la pérdida total de la gestación. Para evitar que esto suceda sería recomendable:

- Mantener separadas cerdas primerizas del resto.
- En caso de alojar a las cerdas en jaulas individuales las primerizas deberían someterse antes de la cubrición a un período de adaptación a estas jaulas.
- Evitar mover las cerdas y primerizas durante estos primeros 35 días, incluso aunque estos movimientos parezcan poco importantes como podría ser el reordenar las cerdas.
- Mantener siempre a las cerdas en condiciones de termo-neutralidad, evitando temperaturas inferiores a 15°C y superiores a los 28°C

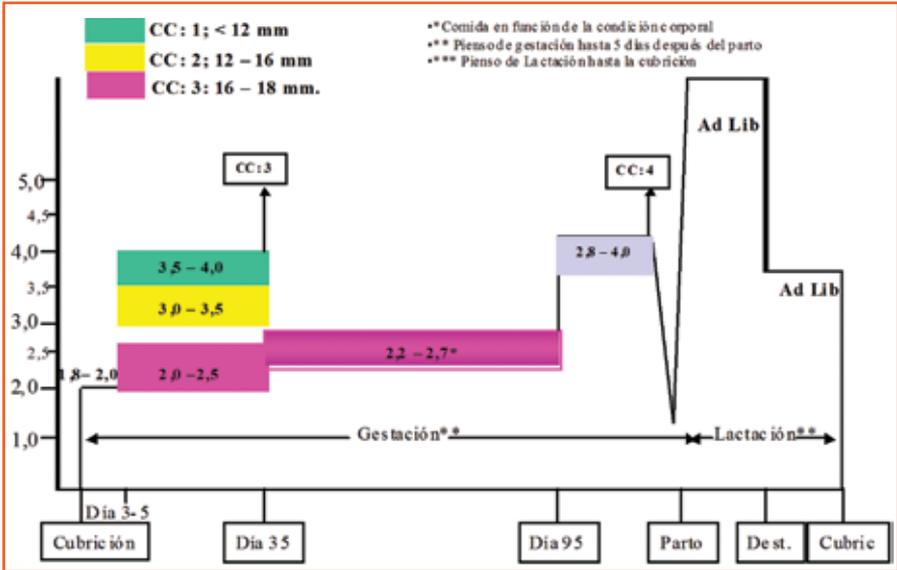
Superada esta primera fase, la gestación será más estable y la cerda resistirá mejor las situaciones de estrés, pero no hay que olvidar que en casos de un estrés fuerte éste puede llegar a ser causa de aborto, lo que debe tenerse especialmente en cuenta cuando las cerdas se manejan en grupo.

Manejo de la alimentación

Un adecuado manejo de la gestación permitirá reducir la mortalidad embrionaria, a la vez que asegurará un correcto estado de la cerda y un adecuado crecimiento fetal, preparando a la cerda para afrontar la futura lactación. En la alimentación habría que considerar 4 fases:

- a. Primera semana de gestación: Alimentar con cuidado, sin excesiva cantidad de pienso para maximizar la supervivencia embrionaria, sobretodo en primerizas. Como sugerencia, en primerizas podemos hablar de 1,6-2,0 kg/día y en cerdas múltiparas entre 2,0-2,3 kg/día con nutrientes de baja densidad en la dieta (13 Mj de EM/kg y 0,55-0,6% de lisina).
- b. De la primera semana hasta el día 35 de gestación: Alimentar tanto primerizas como múltiparas en función de la condición corporal. El objetivo es conseguir la condición que queramos tener al parto (20-22 mm en P2 al parto) en este período de tiempo.
- c. De los 35 a los 95 días de gestación: Mantener el estado corporal de las cerdas evitando que pierdan peso.

- d. De los 95 días al día antes del parto: Suplementar con 1,5 kg pienso/día la ración anterior, tanto para primerizas como multíparas.



Las restricciones pre-parto que se han venido aconsejando no serán necesarias si se han seguido las pautas aconsejadas. Tan sólo el día anterior a la fecha prevista de parto se reducirá la ración a la mitad, con el fin de evitar tener que estar limpiando comederos el día del parto.

10

Control de las condiciones ambientales en el centro de inseminación artificial porcino



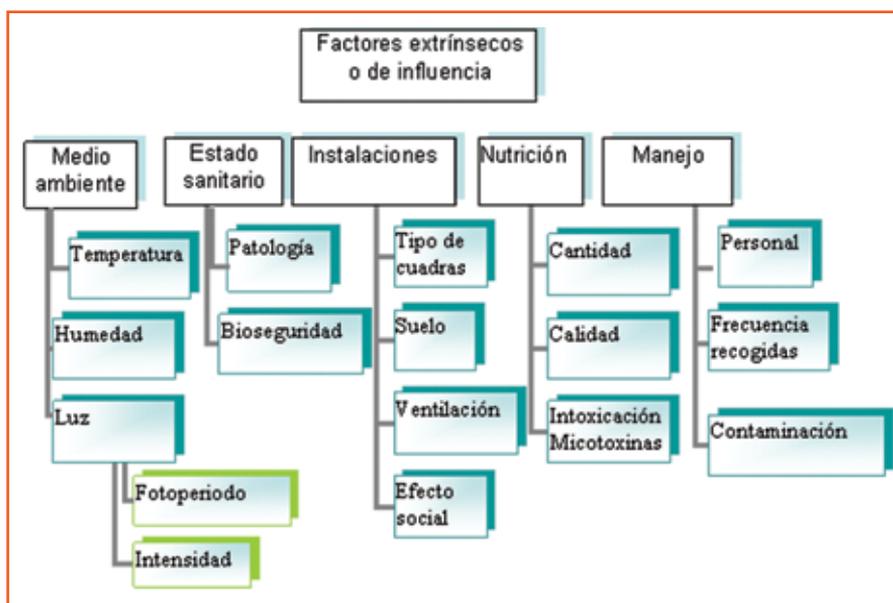
Swine Artificial Insemination
KUBUS S.A.
Inseminación Artificial Porcina

Para conseguir una máxima expresión del potencial genético en las explotaciones porcinas hay que proporcionar un medio ambiente adecuado. En el caso de los centros de inseminación artificial porcina, el mantenimiento y control de las condiciones ambientales de los verracos es fundamental para obtener una producción seminal homogénea y de alta calidad. El control ambiental (temperatura, humedad, ventilación, concentración de gases, luz...) manteniendo unos rangos óptimos que aseguren el bienestar y confort de los verracos, ayudará a mejorar los índices técnicos (productividad) y económicos (coste/dosis) del centro inseminación.

Influencia de factores ambientales sobre la capacidad reproductiva del verraco.

Existen una serie de factores externos al propio verraco que pueden afectar tanto a su aptitud reproductiva (libido y calidad seminal), como a su aptitud física (aplomos y funcionamiento de su aparato genital).

Sistemas de acondicionamiento ambiental:



Para la selección del sistema más idóneo para el centro de inseminación (CIA), hay que tener en cuenta diversos factores como:

- Situación geográfica del centro de inseminación
- Dimensiones y disposición de la nave
- Condiciones de aislamiento térmico
- Número y tipo de animales alojados
- Tipo de alojamiento

Durante las épocas de calor intenso, la diferencia de temperatura entre el exterior e interior de la nave se reduce, y además hay que añadir el calor que desprenden los animales, lo cual hace que no se pueda conseguir mantener una temperatura en el interior de la nave inferior a 5°C con respecto a la exterior. Ello hace imprescindible el uso de sistemas de refrigeración.

La refrigeración de la nave puede hacerse por medios de sistemas evaporativos a depresión (pared húmeda) o evaporación a sobrepresión (coolings). El sistema mediante pared húmeda, sólo es eficaz en zonas con humedades relativas bajas durante el verano. Es importante que el chorro de aire fresco sea disperso, y que no caiga directamente sobre los animales.

En ciertas áreas geográficas de temperaturas bajas durante el invierno, puede ser necesario incorporar un sistema de calefacción (mediante aire o agua caliente)

Entre los factores medioambientales que afectan a la capacidad reproductiva del verraco tenemos:

1. Temperatura

Temperatura óptima recomendada 16–22°C

Es uno de los factores de mayor influencia sobre la fertilidad del verraco.

En el testículo existen mecanismos fisiológicos de termorregulación para el mantenimiento de una temperatura intratesticular óptima, ya que la espermatogénesis (producción de espermatozoides) es muy sensible a las altas temperaturas.

El plexo pampiniforme es una estructura vascular en forma de red entrelazada, especializada en el control de temperatura en los testículos, mediante un sistema de intercambio de temperatura. El calor de la sangre caliente (39°C) procedente del cuerpo se transfiere hacia los vasos venosos que retornan con sangre venosa más fría procedente de la superficie testicular. Esta sangre venosa se va enfriando al recorrer la superficie del escroto. El músculo cremáster ayuda a sostener a los testículos y participa en el control de la temperatura testicular. Cuando la temperatura ambiental es baja, este músculo se contrae, acercando los testículos hacia el cuerpo del animal. Si la temperatura es elevada, se relaja el músculo, permitiendo que los testículos se separen del cuerpo, facilitando su aireación. La función de la piel escrotal es muy importante, ya que tiene sensores de temperatura, que regulan el ritmo de respiraciones del animal (jadeo). De esta manera, favorece la eliminación del calor mediante evaporación a nivel de mucosa respiratoria.

Otro mecanismo de termorregulación a nivel de testículos se realiza mediante la contracción y relajación de la túnica dartos. Durante las épocas frías, se contrae, arrugando la superficie de la piel del escroto, minimizando las pérdidas de

calor. Durante las épocas calurosas, la túnica dartos se relaja, y la superficie del escroto aumenta considerablemente, facilitando el enfriamiento.

En el verraco, debido a la disposición del escroto y a su escasa capacidad de sudoración, existe una relación directa entre la temperatura corporal y la temperatura intratesticular. La temperatura intratesticular es de 35-36,5°C, normalmente 2,5°C menos que la temperatura rectal.

Altas temperaturas:

Cuando la temperatura de la nave supera la zona de termoneutralidad del verraco (temperatura crítica máxima: 29°C, se producen unas alteraciones debidas al stress térmico.

Como consecuencia, se altera la funcionalidad de la hipófisis, reduciéndose la liberación de gonadotropinas, que tienen acción sobre la espermatogénesis. que produce alteración en la producción de semen, observándose:

- Incremento de formas anormales,
- Descenso de motilidad,
- Reducción de porcentaje de acrosomas normales.
- Alteración en la viabilidad espermática.
- Disminución de la capacidad de conservación de las dosis seminales a lo largo del tiempo.

Los efectos por estrés térmicos son muy variables, pudiéndose observar variaciones individuales y por razas o líneas genéticas. Ciertos verracos logran adaptarse a las altas temperaturas, si esta elevación es gradual. Cuando las diferencias de temperatura entre el día y la noche, superan los 10°C y la humedad relativa es muy elevada (superior al 90%), la capacidad de adaptación se dificulta, aumentando la sensibilidad al estrés.

Cuando se producen altas temperaturas ambientales persistentes por más de 48 horas, la diferencia de temperatura intratesticular y corporal se reduce, y provoca los problemas en la producción espermática.

El intervalo de tiempo entre el inicio del stress térmico y la aparición de alteraciones espermáticas, nos pueden indicar a qué nivel del ciclo espermátogénico se produce la alteración.

Varios estudios han demostrado que el stress térmico incide especialmente sobre la espermatomiogénesis, es decir la fase final de la espermatogénesis. Así pues, las espermátidas y los espermatozoides jóvenes inmaduros son más sensibles a los efectos negativos de las altas temperaturas, que los espermatozoides maduros almacenados en el epidídimo y que las espermatogonias (fases iniciales de la espermatogénesis).

Es por ello que el descenso en la calidad seminal se suele detectar a las 2 o 3 semanas de la exposición a altas temperaturas. Después, pasan 5-6 semanas de calidad seminal reducida, que es el periodo de recuperación, hasta que se completa el ciclo espermático, que dura en total 7 semanas.

Bajas temperaturas:

Las bajas temperaturas (nunca por debajo de los 10°C) son menos críticas en la producción o calidad seminal, siempre y cuando se aumente de forma adecuada el aporte de pienso, para que el macho no se vea obligado a recurrir a sus reservas corporales. Uno de los efectos más directos que producen las bajas temperaturas de la nave sobre el verraco es una disminución de su libido. Por eso, en ciertas áreas geográficas de climas fríos se hace necesario el uso de sistemas de calefacción.

El uso de cama abundante de paja (preferiblemente de cebada) en los alojamientos de los verracos ayuda a elevar la temperatura en la zona de descanso del verraco en 3-4°C, y se ha comprobado que tiene incidencia positiva sobre la calidad seminal, ya que además reduce la humedad del suelo, y disminuyen los problemas de patas en los verracos.

2. Humedad relativa

Humedad relativa recomendada: 60-75%

El grado higrométrico tiene una influencia directa sobre la eficacia reproductiva del verraco, recomendándose una humedad relativa del aire en torno al 60-75%.

La relación entre humedad y temperatura se denomina índice de calor. Este valor hace referencia a la sensación térmica que tiene el cuerpo cuando se combinan altas temperaturas con la humedad ambiental. La influencia de la humedad empieza a ser notable a partir de los 26°C.

En el área sombreada de azul se pueden ver los índices de calor inferiores a 29°C, que sería la zona de confort del verraco.

La humedad relativa elevada agrava el stress por calor, al reducir la capacidad de eliminación del calor corporal por evaporación a través del aumento del ritmo de respiraciones (jadeo).

Además, un aire excesivamente húmedo es menos aislante que el seco, con lo cual el local será más frío cuando bajen las temperaturas. Si además la nave no tiene un aislamiento adecuado, el exceso de humedad se condensa en las paredes y favorece el deterioro de las instalaciones.

Otro problema añadido a la humedad elevada es que favorece la proliferación

de microorganismos. En los suelos húmedos se produce gran proliferación de bacterias de diversos orígenes (agua, heces, alimento...). De ahí la importancia de una limpieza eficaz y el uso de productos desinfectantes y secantes, que reduzcan la humedad del alojamiento.

Además muchos microorganismos que se transmiten por vía aerógena necesitan un nivel determinado de humedad. El nivel de humedad relativo idóneo para reducir la proliferación de bacterias, virus, hongos, estaría entre 40-60%. La reducción en el grado de humedad relativa de 90 a 80% puede suponer una reducción de la transmisión aérea de microorganismos patógenos en un 50%. El encharcamiento de los suelos puede provocar también aumento sensible de la población de larvas de moscas y otros insectos, aumentando la incidencia de las parasitosis.

El exceso de humedad en el suelo también tiene un efecto negativo sobre las pezuñas de los verracos, produciendo su reblandecimiento, y como consecuencia, un aumento de problemas locomotores.

3. Ventilación:

Para conseguir una temperatura y una humedad adecuada, es necesaria una ventilación correcta. El caudal de aire de ventilación dinámica debe calcularse según las circunstancias particulares de la instalación. Normalmente, para los verracos oscila desde 36 m³/h en invierno hasta los 360 m³/h en verano. También es importante conocer la velocidad del aire, ya que influye en la pérdida de calor de los animales, y en las patologías respiratorias. Así pues, temperaturas de confort para los verracos pueden ser inadecuadas si la velocidad del aire de entrada de aire fresco es excesiva.

Velocidad de aire recomendada: 0.2 – 0.7 m/s.

La ventilación es necesaria para la renovación de aire:

- para proveer de oxígeno
- para ayudar al intercambio con el exterior de CO₂
- eliminar el exceso de humedad que se produce en el interior del alojamiento como consecuencia de la respiración del ganado, y por la evaporación de orines y aguas de limpieza.
- eliminación de malos olores
- eliminación de gases nocivos
- eliminación de polvo y partículas en suspensión.

4. Concentración de gases:

Se producen como consecuencia de la respiración de los animales (CO₂) y de la fermentación de la materia orgánica del purín (amoníaco y ácido sulfhídrico).

Concentraciones elevadas de estos gases pueden afectar al bienestar de los verracos.

Concentraciones máximas de gases recomendadas:

Así pues, concentraciones elevadas de amoníaco pueden originar, desde irritación leve de ojos, hasta irritación de fosas nasales y garganta. En el caso del ácido sulfhídrico puede originar pérdida de apetito e incluso dificultad respiratoria, y problemas neurológicos. Los niveles elevados de dióxido de carbono nos indican un problema en la ventilación de la nave.

5. Luz y fotoperiodo.

Ciertos problemas de productividad y calidad seminal que se observan en los verracos pueden estar asociados a un efecto estacional, que combina cambios de temperatura y de fotoperiodo.

El volumen y el pH del eyaculado son muy dependientes de la actividad secretora de glándulas accesorias, que está muy influenciada por los cambios en el fotoperiodo. La exposición de verracos a días más largos mejora la función testicular, aumentando la concentración de testosterona. Según diversos autores, la concentración y número de dosis se reduce en fotoperiodo decreciente. El grado de afectación depende de la raza e individuo.

En cuanto a la iluminación, se ha estudiado que también afecta a la concentración de espermatozoides, producción de esteroides y la libido. Es importante tener una buena luz natural y garantizar un periodo de 10-12 horas de luz diario, suplementando cuando sea necesario con luz artificial. La luz fluorescente es mejor que la incandescente porque evita sombras y distribuye mejor la luz. La luminosidad recomendada para el CIA es de 250-300 luxes a la altura de la cabeza de los verracos.

Estudio sobre diferencias en calidad seminal según el tipo de control ambiental.

Se han realizado diversos estudios sobre la incidencia del control ambiental en los centros de inseminación artificial sobre la calidad seminal:

El control de las condiciones ambientales en un CIA mejora el bienestar de los verracos, y favorece que se consiga una mayor producción de semen, de forma estable a lo largo del año, con una calidad seminal superior.