



Buenas prácticas en inseminación artificial I: Preparación de dosis seminales.

Los factores responsables de la variación de los resultados de fertilidad y prolificidad de la IA

Lavara R; Mocé E; Vicente J.S.

Laboratorio Biotecnología de la Reproducción.
Departamento de Ciencia Animal.
Universidad Politécnica de Valencia.
Camino de Vera s/n, 46071 Valencia (España).



A principios de los años 70 se mostraron las posibilidades de utilización de la inseminación artificial para la producción de carne de conejo, pero no fue hasta finales de los años 80 cuando se generalizó su uso en las granjas, ligado fundamentalmente a la posibilidad de utilización de semen procedente de machos seleccionados.

Son numerosos los trabajos en los que se han enumerado las ventajas e inconvenientes de la utilización de la inseminación artificial. Lo que se pretende con el presente trabajo es explicar los factores responsables de la variación de los resultados de fertilidad y prolificidad. Dichos factores los agruparemos en tres grandes bloques:

- **Bloque I:** Factores ligados a la preparación de dosis seminales.
- **Bloque II:** Factores ligados a las hembras.
- **Bloque III:** Factores ligados a la técnica de inseminación.

En este primer artículo abordaremos el Bloque I donde se aconsejan pautas a seguir en la preparación de las dosis seminales.



La extracción del semen se realiza en la jaula del macho y como cebo se puede utilizar una coneja, una piel de coneja u otros dispositivos de simulación.

EDAD Y FRECUENCIA DE RECUPERACIÓN

Normalmente la primera vez que un macho presenta comportamiento de monta (alrededor de los 4 meses de edad) no eyacula y, en caso de que eyacule, el semen no es apto para utilizarlo como componente de la mezcla heterospérmica (pool) con la que se realizarán las inseminaciones.

FABRICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE MATERIAL PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE CONEJOS E INSTRUMENTAL VETERINARIO



Neveras de conservación de semen de 70 litros.



Neveras para transporte de semen y vacunas.



Vestuario desechable para entrada en granjas.



Baño María (Varios modelos y tamaños).



Microscopios (Varios modelos).



Jeringa Automática Dermojet.

REPARACIÓN DE
BIBINA DE
DERMOJET CON
RECAMBIOS
ORIGINALES.



Jeringa Dermojet.

Montaje de laboratorios de I.A. en conejos.

- Estufas de Esterilización.
- Cámaras de burquer.
- Hemocitómetros.
- Eosina.
- Termómetros.
- Diluyentes de semen.
- Cubre-objetos.
- Porta-objetos.
- Jeringas y agujas.



Cánulas curvadas.



Colector diluido.



Vagina artificial.

Cámara recolectora.

Colector de semen.



Polígono Industrial Torrefarrera - C/ Ponent, s/n.
Tel. 973 75 03 13 - Fax 973 75 17 72
25123 TORREFARRERA Lleida

e-mail: inserbo@inserbo.com
www.inserbo.com

naciones. Por lo general, en las primeras eyaculaciones aparecen porcentajes elevados de espermatozoides inmaduros y con anomalías morfológicas y baja movilidad. Serán necesarias cuatro recuperaciones aptas (entendiéndose como recuperación apta el eyaculado cuya valoración macroscópica y microscópica sea calificada como apta) para que el semen de un macho sea utilizado para formar parte del pool (o como integrante de la mezcla heterospérmica final).

Existen diferencias entre líneas en la edad a la que manifiestan comportamiento de monta. Por lo general, en líneas o razas de gran formato (5 a 7Kg) los machos no manifiestan comportamiento de monta hasta los 5 o incluso los 6 meses de edad. Una buena práctica es comenzar a extraer los primeros eyaculados con vagina artificial a los 5 meses de edad, recuperando un eyaculado por semana durante las tres o cuatro primeras semanas, e instaurar posteriormente el ritmo de recuperación elegido. El macho alcanza la plena producción espermática entre los 9-11 meses de edad dependiendo de las condiciones ambientales.

El ritmo de recuperaciones recomendado varía entre dos y tres extracciones por macho y por semana, siendo variable en función de la línea genética utilizada.

La frecuencia de recuperación de los eyaculados ha sido estudiada por numerosos investigadores sobre diversas líneas genéticas que son habitualmente utilizadas en las granjas españolas. Por lo general, el ritmo de recuperaciones recomendado varía entre dos y tres extracciones por macho y por semana, siendo variable en función de la línea genética utilizada. Para los machos seleccionados por velocidad de crecimiento, lo más recomendable es utilizar un ritmo de dos extracciones semanales con un intervalo de tiempo entre ellas de al menos 30 minutos.

RECUPERACIÓN DEL EYACULADO

Para recuperar el eyaculado, se utiliza la vagina artificial, a la que se acopla un tubo colector para recoger el semen. (Foto



Foto 2. Vagina artificial, lo más aconsejable es el uso de camisas de látex desechables para conseguir un mejor estado sanitario del semen aunque se produzca un aumento del coste de la dosis seminal.

2) La temperatura del fluido que se encuentre entre la camisa y el cuerpo de la vagina debería encontrarse en torno a los 50°C en el momento de la recuperación, de forma que el fluido deberá ser calentado hasta los 55-60°C. Los tubos colectores deberían estar atemperados a unos 20°C (Foto 3) y es muy recomendable cerrarlos con un tapón tras la recogida del semen para evitar la contaminación de los eyaculados con sustancias extrañas (incluyéndose el agua). Es también necesario proteger a los eyaculados de la luz directa mediante el uso de gradillas de poliestireno expandido o similares, ya que la incidencia directa de la luz provoca daños en los espermatozoides (foto 4).

La extracción del semen, al igual que la monta natural, se realiza en la jaula del macho (foto 5). Son pocos los machos que manifiestan rechazo al uso de la vagina artificial, y como cebo se puede utilizar



Foto 3 y 4. Tubos Colectores, una vez atemperados deben ser transportados en gradillas



Foto 5. Tras la estimulación del macho se procede a la extracción con la vagina artificial.

una coneja, una piel de coneja u otros dispositivos de simulación. A ser posible los machos deberán estar alojados en jaulas contiguas. Para estimular al macho antes de la recogida se puede introducir la coneja en la jaula y dejar que se produzca el "cortejo" sexual pero no la monta. Otros métodos de estimulación son el uso de maniquíes y el de agrupación de machos, aunque este último método puede dar lugar a peleas entre machos. Es conveniente tener asignada una vagina artificial por jaula-macho. Para el revestimiento de la vagina artificial se comercializan camisas de látex reutilizables, pero lo más aconsejable es el uso de camisas de látex desechables para conseguir un mejor estado sanitario del

semen aunque se produzca un aumento del coste de la dosis seminal.

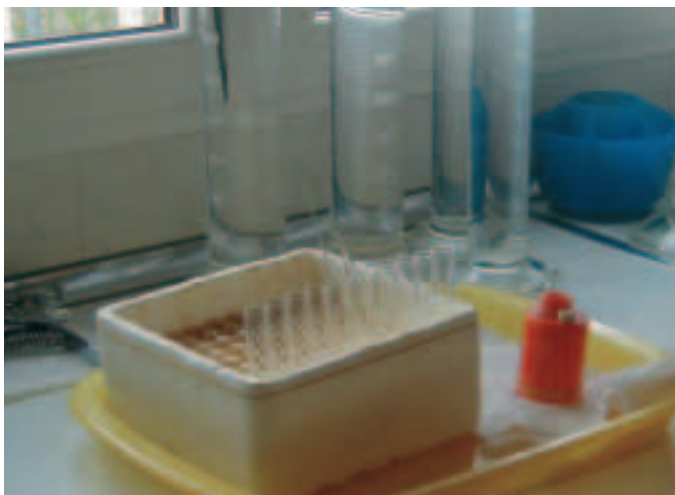
VALORACIÓN MACROSCÓPICA

Una vez recuperado el eyaculado, tendremos que proceder a la valoración macroscópica del mismo, (foto 6) observándose la coloración, la presencia de gel o tampón mucoso, sedimentos etc.

Algunos machos se orinan continuamente, o proporcionan eyaculados con apariencia pastosa. Estos problemas pueden estar provocados por una mala estimulación previa del macho. El porcentaje de eyaculados no útiles (presencia de orina) también aumenta cuando el agua del interior de la vagina artificial se enfría.

Lo primero que hay que observar es que el eyaculado esté libre de orina, que es fácilmente visible por su coloración. Se valoran como aptos aquellos eyaculados que presentan color blanco-nacarado, desestimándose los que presentan coloraciones amarillentas (presencia de orina), rojizas-parduzcas (presencia sangre por lesiones), etc.

El porcentaje de eyaculados que presentan gel (o tapón mucoso) varía dependiendo de la estación del año, siendo más habitual su presencia en los eyaculados recuperados en primavera. Es



de poliestireno expandido



Foto 6. Se debe valorar la coloración, la presencia de gel o tampón mucoso, sedimentos de cada eyaculado.

necesario proceder a la extracción del gel mediante pinzas metálicas atemperadas (en el caso de que el gel tenga una apariencia sólida o semi-sólida), o con ayuda de pipetas de plástico desechables también atemperadas a unos 20°C (en el caso de que el gel sea muy líquido).

DILUCIÓN

Tras la valoración macroscópica del semen, hay que proceder a la dilución de los eyaculados aptos. Es recomendable diluir el semen inmediatamente después de su recuperación no dejando pasar más de 5-10 minutos desde su extracción hasta su dilución. Se realizan diluciones 1:5 (a 1ml de semen, se le añadirían 4ml de diluyente). La temperatura del diluyente no debería ser superior a los 22-25°C, ya que la temperatura de conservación de las dosis seminales se sitúa entre los 17-19°C, evitándose de esta manera en lo posible el choque térmico. Debería también evitarse añadir el diluyente bruscamente al eyaculado (dejándolo resbalar por las paredes del tubo colector poco a poco) y conviene agitar suavemente para que la dilución sea lo más homogénea posible.

El diluyente empleado tiene que ser un medio capaz de mantener la viabilidad los espermatozoides durante al menos 24 horas, para contemplar posibles dilataciones en el tiempo de inseminación. Los diluyentes más utilizados actualmente están constituidos por tampones orgánicos como el TRIS, al que se añade una fuente energética como la glucosa o la fructosa, antioxidantes, agentes quelan-

Los eyaculados aptos son los que presentan color blanco-nacarado, desestimándose los que presentan otras coloraciones

tes y antibióticos para controlar el crecimiento bacteriano, si el diluyente elegido careciese de antibióticos deberán ser añadidos posteriormente. Cualquiera de los diluyentes que son comercializados para la dilución del semen de conejos ofrecen buenos resultados tras la inseminación con semen fresco. Con todos los diluyentes la motilidad del semen refrigerado entre 17-19°C se conserva durante largos periodos de tiempo, pero los espermatozoides sufren una disminución de su capacidad fecundante a medida que aumenta el tiempo de conservación, solo pueden obtenerse buenos resultados de fertilidad con semen conservado hasta 48 horas.

VALORACIÓN DE LA MOTILIDAD

Una vez realizada la dilución del eyaculado (1:5) se procede a su valoración microscópica. Una buena práctica es valorar los eyaculados de forma individual antes de mezclarlos, para eliminar aquellos que presenten características no deseables. Para la valoración microscópica, se coloca una gota del eyaculado entre un portaobjetos y un cubreobjetos atemperados a 37°C (sobre una platina termostataada)(foto8) con la ayuda de una pipeta Pasteur, y se observa al microscopio a 400 aumentos con óptica de campo claro.

En la valoración microscópica se evalúa el porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad del movimiento (trayectorias rectilíneas). Si la temperatura de evaluación es de 37°C, al menos un 50% de los espermatozoides debería presentar un movimiento rectilíneo y uniforme. No obstante, si no se dispone de una placa termostataada, y la temperatura ambiental es baja, los espermatozoides no se desplazan de forma rectilínea, sino que presentan movimientos vibratorios, y su velocidad de desplazamiento es lenta. Aquellos eyaculados que presenten menos del 70% de espermatozoides móviles o bien que presenten un elevado porcentaje de espermatozoides con movimiento circular (en lugar de rectilíneo) deberán eliminarse, y no serán utili-

FERTILINE DOBLE ACCIÓN

2. Aumenta la inmunidad

2 en 1

1. Mejora la fertilidad



FERTILINE DOBLE ACCIÓN

1. Mejora la fertilidad

Mejora el estado corporal de las reproductoras, reduciendo las pérdidas de peso durante la lactación, que afectan directamente a la producción de leche y a la receptividad y eclosión de las madres, especialmente las primíparas. El aporte de un suplemento energético y con aminoácidos esenciales, beta-caroteno y vitamina E permite reducir estas pérdidas aumentando las tasas de palpaciones positivas y el peso de las camadas al destete.

2. Aumenta la inmunidad

El nivel inmune de las conejas puede verse comprometido por su estado físico o por situaciones de estrés (cambios de temperatura, parto, manejo, patologías, etc.) lo que repercute directamente en la mortalidad de las hembras y de los gazapos. FERTILINE es un aporte suplementario de vitaminas (vitamina E, K, complejo B) y minerales (selenio, zinc, hierro) que permiten mejorar su estado inmunitario y el de su camada.



Ctra. Madrid - Barcelona, Km 33,300
tel.: 91 877 60 90 fax: 91 880 58 00
28905 ALCALA DE HENARES (Madrid)
www.saprogal.com

GAMA DE PRODUCTOS



- **Antibióticos**
- **Aminoácidos**
- **Vitaminas**
- **Premezclas**
- **Fungicidas**
- **Desinfectantes**
- **Insecticidas**



s.p. veterinaria, s.a.



Foto 8. Para la valoración microscópica, se coloca una gota del eyaculado entre un portaobjetos y un cubreobjetos atemperados a 37°C

zados para la constitución del pool final. Otros parámetros a tener en cuenta a la hora de la valoración microscópica del eyaculado serán la presencia de aglutinaciones (espermatozoides aglutinados, foto 9), de células descamativas (fácilmente identificables por su gran tamaño y forma redondeada) y presencia de cuerpos extraños; los eyaculados que presenten este tipo de anomalías deberán ser también eliminados (foto 10)

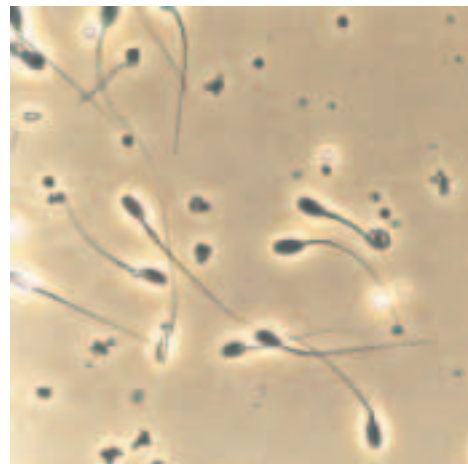


Foto 10. Eyaculado con anomalías

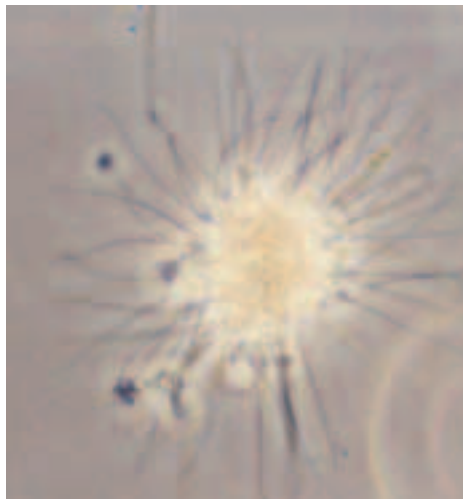


Foto 9. Espermatozoides aglutinados.

En resumen, tras la valoración microscópica de los eyaculados, se considera apto el eyaculado que presente una motilidad superior al 70%, con trayectorias rectilíneas, escaso número de espermatozoides aglutinados y baja concentración de células descamativas. Los eyaculados aptos serán los integrantes de la mezcla heterospérmica final.

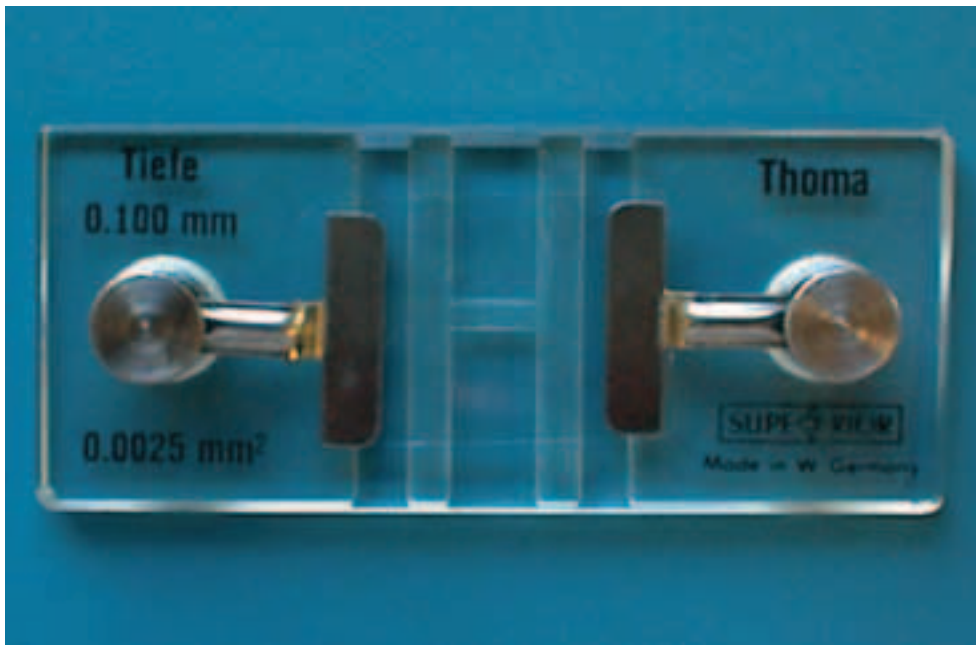


Foto 11. Cámara de recuento celular.

RECuento ESPERMATOZOIDES Y OPTIMIZACIÓN DOSIS SEMINALES

Una vez realizada la mezcla de eyaculados, hay que optimizar el número de dosis de inseminación. Para ello, es necesario conocer la concentración (número de espermatozoides por mililitro) de espermatozoides de la mezcla, que será estimada mediante las cámaras de recuento celular (Burker, Neubauer, Thoma, foto11).

Para el recuento de la concentración espermática, es necesario fijar una pequeña cantidad de muestra, utilizando una solución de glutaraldehído o de formaldehído. Normalmente, se realizan diluciones 1:10 (a 0,1ml de semen diluido, se le añaden 0,9ml de una solución de glutaraldehído al 0,25%). Una vez fijada la muestra se procede al llenado de la cámara de recuento por capilaridad y se realiza el conteo bajo microscopio a 400 aumentos en campo claro. En caso de utilizar las cámaras Thoma o Neubauer modificada, se contabiliza el número de cabezas de espermatozoides existentes en los cuadrados de las 4 diagonales con que cuenta la cámara. Una vez que se conoce el número de espermatozoides se aplica la fórmula siguiente para calcular la concentración (o número de espermatozoides por mililitro):

$$\text{N}^\circ \text{ espermatozoides / ml} = \frac{\text{n}^\circ \text{ cabezas espermatozoides}}{2} \times \text{dilución} \times 100.000$$

Conociendo la concentración y el volumen (en mililitros) del pool, se calcula la producción (cantidad total de espermatozoides del pool). La producción se calcula multiplicando la concentración por el volumen del pool.

Las dosis seminales debe tener de 12 a 16 millones de espermatozoides, por hembra, en el caso de inseminaciones realizadas con semen conservado de 12 a 36 horas.

El **número potencial de dosis de la mezcla** depende de la cantidad de espermatozoides utilizados por dosis de inseminación. La dosis de inseminación cuando se utiliza semen fresco puede variar entre 6 millones y 20 millones de espermatozoides por hembra; en algunos trabajos científicos, se ha observado que los resultados de fertilidad y de prolificidad se mantienen incluso cuando se emplean dosis de 4 millones de espermatozoides/hembra. No obstante, aunque el límite para realizar las inseminaciones parece encontrarse en un número inferior a los 4 millones de espermatozoides por dosis, se aconseja utilizar a nivel comercial 6 millones de espermatozoides por dosis para paliar posibles errores de manejo o de mala conservación del semen.

Parámetros de calidad seminal

- Porcentajes de motilidad (superior al 70%)
- Normalidad acrosómica (superior al 80%)
- Gota citoplasmática (inferior al 10%)
- Espermatozoides anormales (inferior al 15%)



En las muestras fijadas, se pueden estimar otros parámetros de calidad seminal, como el estado del acrosoma, presencia de gota citoplasmática y de anomalías morfológicas del eyaculado.

- **Porcentaje de espermatozoides con acrosomas no dañados.** Debería ser superior al 80%, aunque el porcentaje puede ser menor en el caso de que los animales sean jóvenes, o por un mal manejo del semen (entrada de agua en la recogida del eyaculado, choque térmico). Los acrosomas se pueden observar con microscopios con óptica de contraste de fases negativo o interferencial de Nomarski, aunque también se pueden realizar triples tinciones (evaluación en microscopios de campo claro), o bien tinción con marcadores fluorescentes (lectinas como FITC-PNA o FITC-PSA) y valoración mediante un microscopio equipado con epifluorescencia. Si hay un porcentaje elevado de espermatozoides con acrosomas dañados en el eyaculado, la fertilidad se reduce.
- **Porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática.** No debería ser mayor del 6-10%. La gota citoplasmática está presente en espermatozoides que no han completado su maduración. Su aparición podría ser indicador de un ritmo de recuperación muy intenso, de una patología o de condiciones ambientales inadecuadas (mala ventilación).
- **Porcentaje de espermatozoides anormales.** Debería ser menor del 10-15%.

Si aparecen en gran cantidad, puede indicar patología, o ritmos de recuperación demasiado extensivos. En algunos estudios, se ha observado una disminución del número de nacidos conforme aumenta el porcentaje de espermatozoides anormales.

Estos análisis deberían realizarse de forma rutinaria en los centros de inseminación para asegurar que la calidad del semen comercializado es óptima.

Tras los análisis y habiéndose obtenido valores aceptables en todos los parámetros de calidad: porcentajes de motilidad (superior al 70%), normalidad acrosómica (superior al 80%), gota citoplasmática (inferior al 10%) y espermatozoides anormales (inferior al 15%) y conocida la cantidad total de espermatozoides se procede a la dilución final del pool (siempre dependiendo de la dosis de inseminación que vaya a ser utilizada). Es necesario conservar las dosis seminales a temperaturas comprendidas entre los 17-19°C, en un lugar donde no incida la luz directa, hasta el momento de la inseminación. Conforme aumenta el tiempo de conservación será necesario aumentar el número de espermatozoides por dosis, utilizándose 6-8 millones por dosis, para inseminaciones realizadas en las primeras 12 horas, duplicando el número de espermatozoides (12-16 millones por hembra) en el caso de inseminaciones realizadas con semen conservado 12-36 horas.

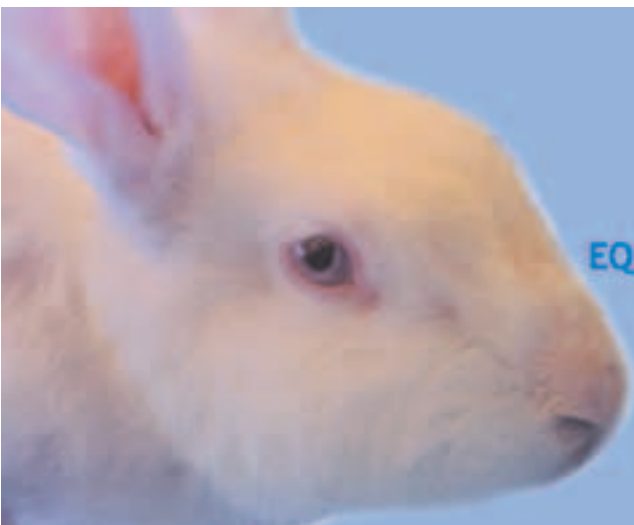


Los machos deben encontrarse en un perfecto estado sanitario para producir semen de calidad.

Manejo de los machos

No hay que olvidar que para conseguir que los machos produzcan semen de calidad el ambiente y la alimentación deben ser adecuadas. De la misma forma, no hay que descuidar el estado sanitario de los sementales, que tiene que ser excelente. En cunicultura para que los reproductores permanezcan protegidos frente a virus como los causantes

de la Mixomatosis y la Enfermedad vírica hemorrágica (VHD) se recomienda la vacunación. En el caso de la mixomatosis algunos programas de vacunación utilizan en alguna de sus etapas vacunas homólogas, pero es recomendable no utilizarlas sobre machos donantes de semen ya que existen evidencias de transmisión vía semen del virus de la mixomatosis tras la vacunación de los machos con este tipo de vacunas.



**EQUIPOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL PARA CUNICULTURA
CROTALES DE CONEJOS**

Antoni de Capmany, 63 - 08301 Mataró (Barcelona-Spain)
Tel. +34 93 790 37 73 - Fax. +34 93 755 16 17
www.strongtag.es - e-mail: strong@tresnet.com