

Inseminación Artificial.

- 8.1. Introducción.
- 8.2. Bases analíticas experimentales.
 - 8.2.1. Lugar de inseminación.
 - 8.2.2. Intervalos entre inseminaciones.
 - 8.2.3. Hora de inseminación.
 - 8.2.4. Relación del número de espermatozoides y la tasa de fecundación.
 - 8.2.5. Dilución del semen fresco.
- 8.3. Tecnología del semen.
 - 8.3.1. Diluyentes.
 - 8.3.2. Tasa de dilución.
 - 8.3.3. Utilización del semen diluido.
 - 8.3.4. Congelación del semen.
- 8.4. Realización de la inseminación artificial.

8.1. Introducción.

Durante mucho tiempo, el estudio de la inseminación artificial se ha limitado a:

- * La técnica de la recogida del semen.
- * Aplicación a las reproductoras.
- * Formulación de los diluyentes.

Actualmente esta situación ha cambiado y la inseminación artificial debe considerarse como un sistema industrial de reproducción que incluye además de los aspectos anteriores, métodos especializados de cría-recría así como de utilización de los reproductores, todo esto acompañado de una gestión técnica y económica particularmente rigurosa.

8.2. Bases analíticas experimentales.

Puesto que ya se han estudiado los métodos de obtención del semen, la anatomía del oviducto así como la supervivencia de los espermatozoides, seguidamente se estudiarán otros aspectos de gran importancia para el éxito de la inseminación artificial.

8.2.1. Lugar de inseminación.

Es posible efectuar inseminaciones artificiales experimentales a diferentes niveles del tracto genital femenino: vagina, útero, mágnum e incluso ovario. Como norma general las inseminaciones realizadas más allá de la vagina dan lugar a elevadas tasas de fecundación. Sin embargo, se trata de técnicas difíciles por lo que en la práctica se emplean poco.

Cuando la inseminación tiene lugar en la vagina, los resultados obtenidos difieren bastante según la profundidad a la que se deposite el semen. Se pensó, que cuanto más próximo a la unión útero-vaginal fuera el depósito mejores deberían

ser los resultados de la fecundación ya que en esta unión se almacenan los espermatozoides. Sin embargo, los resultados obtenidos son diferentes según los autores y las especies. En las gallinas se recomienda que las inseminaciones se realicen en la zona media de la vagina para evitar el daño de la unión útero-vaginal y también se minimizan los riesgos de expulsión de los espermatozoides. En las especies en las que es fácil provocar la eversión de la vagina por presión de la mano sobre el abdomen del ave (gallina, pava) debe reducirse dicha presión desde el momento que se introduce la cánula y especialmente antes de la introducción de los espermatozoides para evitar en lo posible el reflujo.

8.2.2. Intervalos entre inseminaciones.

Como ya se ha visto, los espermatozoides almacenados en las glándulas del oviducto pueden sobrevivir en ellas conservando su poder fecundante y ser liberados durante un periodo máximo de 21 días en el caso de la gallina y 60 en la pava. Este periodo se denomina periodo fértil aunque en realidad se trataría de periodo fecundo para los espermatozoides. La duración de los periodos fértiles puede definirse de dos formas a partir del segundo día después de la inseminación:

1. La duración hasta la puerta del primer huevo claro, es la duración eficaz de un periodo fértil.
2. La duración hasta la puesta del último huevo fecundado. Se trata de la duración máxima del periodo fértil.

Estas duraciones frecuentemente están correlacionadas y varían en función de las hembras y de su estado fisiológico y también en función del número y la calidad de los espermatozoides inseminados, especialmente si éstos han sido almacenados in vitro.

Se ha observado que la tasa de fecundación de los huevos alcanza su nivel máximo al segundo día tras la inseminación y se mantiene en las proximidades de

ese nivel en meseta durante una semana y a continuación se reduce con rapidez según una curva de tipo sigmoïdal para anularse aproximadamente a los 20 días de la inseminación.

De esto se pueden sacar dos conclusiones:

1. Para mantener el nivel óptimo de huevos fecundados es preciso que el intervalo entre inseminaciones consecutivas no supere las duraciones de las mesetas. En realidad, una nueva inseminación debe efectuarse como muy tarde dos días antes de que concluyan dichas mesetas.

2. Si se quiere conocer el origen paterno de los huevos fecundados, el intervalo de las inseminaciones debe ser 2-3 veces mayor para que no existan fecundaciones posibles debidas a inseminaciones artificiales. El intervalo debe ser de 2-3 semanas.

8.2.3. Hora de las inseminaciones.

La actividad cíclica del oviducto influye sobre las condiciones de tránsito y de almacenamiento de los espermatozoides inseminados. El éxito de las inseminaciones varía con el estadio del ciclo de puesta en el momento de la aplicación de los espermatozoides.

Tradicionalmente se estudiaba el momento óptimo de realizar la inseminación en función de la hora del día sin considerar el estadio de puesta. En estas condiciones, las tasas de fecundación obtenidas han sido variables y poco demostrativas.

Cuando se toma como referencia el momento de la oviposición se observan resultados más clarificadores. En este sentido se ha comprobado que la tasa de fecundación es mínima cuando las inseminaciones se realizan en las proximidades de la oviposición y se normaliza cuando los intervalos oviposición-inseminación igualan o superan las 5 horas.

Los deficientes resultados obtenidos cuando la inseminación se efectúa en las proximidades de la oviposición no sólo afectan a los primeros huevos sino también a los puestos en los días siguientes. Ésto hace pensar en dos posibilidades:

1. Que no existan suficientes espermatozoides en el oviducto.
2. Las posibilidades de supervivencia y de fecundación han sido definitivamente alteradas tras su colocación en la hembra.

En la práctica se hace aconsejable inseminar las gallinas al menos 8 horas después del encendido de las luces del gallinero ya que como se ha visto en otros temas, la mayoría de las gallinas ponen unas 4 horas después de iniciado el periodo luminoso.

8.2.4. Relación del número de espermatozoides y la tasa de fecundación.

Las dosis de semen empleadas se definen con frecuencia en función del volumen de semen diluido o no cuando lo realmente importante es el número de espermatozoides inseminados y su capacidad fecundante.

Se ha comprobado que dosis con un número idéntico de espermatozoides procedentes de los mismos espermatozoides pero preparados en diferentes volúmenes dan fecundaciones similares siempre que:

1. Las dosis sean frescas, ni refrigeradas ni congeladas.
2. No exista reflujo al efectuar la introducción del semen.
3. La tasa de dilución del semen no sea suficientemente elevada (1/5).

En relación con este último aspecto se ha comprobado que si se realiza una dilución excesiva se produce una disminución de los espermatozoides y de su poder fecundante. También se ha comprobado que la tasa media de fecundación de los huevos pasa del 8 al 96 % cuando el número de espermatozoides pasa de 1 a 100-200 millones por dosis pero si este número se aumenta no se consiguen mejoras en el porcentaje de fecundaciones.

Por otro lado, una calidad deficiente de los espermatozoides puede obligar también a un aumento de su número en la dosis.

8.2.5. Dilución del semen fresco.

La dilución o no del semen fresco va a depender del tiempo que va a transcurrir hasta que se utilice. Si su utilización se va a llevar a cabo entre 30 y 45 minutos después de su obtención no es necesario diluirlo. Si el plazo es mayor interesa diluirlo y refrigerarlo. En cualquier caso, cualquiera que sea la especie, la dilución del semen no permite en ningún caso inseminar a un mayor número de hembras por eyaculado ya que como se ha indicado anteriormente lo importante es el número de espermatozoides por lo que en el caso de emplear diluciones habrá que inseminar un volumen mayor.

8.3. Tecnología del semen.

8.3.1. Diluyentes.

De un diluyente se espera que sea capaz de preservar la capacidad fecundante de los espermatozoides además de su motilidad. El diluyente también debe tamponar la acidificación del medio consecuencia del metabolismo de los espermatozoides y eventualmente aportar nutrientes esenciales de tipo energético. La capacidad de síntesis lipídica y proteica de los espermatozoides es de hecho muy reducida dado que están desprovistos de aparato de Golgi y sólo contienen cantidades muy pequeñas de ARN. Por último, un diluyente debe ser capaz de “preparar” a los espermatozoides para la congelación.

Si el semen diluido se utiliza sin haber sido congelado, los diluyentes pueden ser simples soluciones tampón que se elegirán en función de su poder de protección de la capacidad fecundante. No se deben utilizar tampones que contengan fosfato sódico. Sin embargo el TES es adecuado a una concentración

que garantice una presión osmótica de 380-400 mosm/l.

Los diluyentes más conocidos como el de Lake o Sexton se caracterizan por cumplir las condiciones de osmolaridad. Estos diluyentes se caracterizan por incluir uno o más sistemas tampones (citrato, acetato...) y por poseer concentraciones muy precisas de algunos electrolitos como (Na, K, Mg) y quelantes (aminoácidos como glutámico y glicina). En general, llevan un solo azúcar, glucosa o fructosa.

Sin embargo, no se ha demostrado que estos diluyentes sean más satisfactorios que el simple TES para conservar el poder fecundante aunque si lo son para conservar la motilidad.

Recientemente se ha empleado con mucho éxito un diluyente a base de leche y clara de huevo. Los resultados muestran tasas de fecundación del 92-99% con un semen almacenado 24 horas y una dosis de 100 millones de espermatozoides/gallina.

8.3.2. Tasa de dilución.

Como ya se ha visto, una dilución excesiva provoca una disminución de la motilidad y de la capacidad fecundante de los espermatozoides, por tanto, la tasa de dilución debe ser la adecuada para asegurar la eficacia del diluyente pero no excesiva. Como norma general, se considera el nivel óptimo de dilución ente $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{3}$.

8.3.3. Utilización del semen diluido.

En experiencias llevadas a cabo en el laboratorio, el plazo de utilización del semen diluido puede llegar hasta las 24-48 horas en el gallo y el pavo siempre que la oxigenación del semen sea buena durante su almacenamiento. En la práctica los resultados de fecundación después de haber almacenado el semen son muy

variables debido a una serie de factores como:

1. Calidad del semen fresco.
2. Aireación durante el almacenamiento.
3. Temperatura del almacenamiento. La temperatura ideal está entre 12-15 °C.
4. Velocidad de enfriamiento de los espermatozoides. La más adecuada es de 1°/minuto.

Los efectos negativos de la conservación del semen sobre la tasa de fecundación son más notables cuanto mayor es la edad de las gallinas.

8.3.4. Congelación del semen.

Los principales inconvenientes para llevar a cabo la congelación del semen son dos:

1. Degradación de las membranas de los espermatozoides causada por la aparición de microcristales y deshidratación que tiene lugar durante la preparación de los espermatozoides para la congelación o en el curso de ésta.
2. Fenómenos de toxicidad debidos al aumento de la concentración intracelular de las soluciones, que lleva asociada la congelación.

La preparación de los espermatozoides para su congelación tiene lugar a una temperatura de 4°C. El semen se va diluyendo volumen por volumen y se le añaden varios crioprotectores como glicerol, DMSO o dimetilacetamida. Estos crioprotectores permiten normalmente la solidificación del agua en estado amorfo sobre todo si se asocian entre ellos o con azúcares. Sin embargo, estos productos sólo alcanzan plenamente esta propiedad a concentraciones muy elevadas que destruyen a los espermatozoides, por eso, el DMSO se utiliza a una concentración del 4 % aunque a esta concentración ya existe una importante destrucción del poder fecundante de los espermatozoides antes incluso de su congelación, por eso

algunos autores prefieren emplear glicerol aunque es un poderoso anticonceptivo para las gallinas.

La congelación propiamente dicha tiene lugar en vapores de nitrógeno con el semen acondicionado en ampollas, pajuelas o en pastillas. Parece que los mejores resultados se obtienen cuando se utilizan pajuelas y la velocidad de enfriamiento es de unos 40 °C/min. La principal dificultad es superar la etapa de sobrefusión evitando al máximo la formación de microcristales. El almacenamiento tiene lugar en nitrógeno líquido.

Especialmente delicado es la descongelación, por un lado debe ser especialmente rápida para limitar el crecimiento de los cristales y por otro lado hay que sustituir el diluyente con glicerol por un diluyente de inseminación. Una vez descongelado el semen, la dosis debe aplicarse inmediatamente.

Los resultados obtenidos con el semen congelado no han sido muy satisfactorios por lo que no se cree que la utilización de semen congelado en avicultura se desarrolle de forma importante.

8.4. Realización de la inseminación artificial.

Cuando se utiliza semen puro y por tanto se aplica rápidamente, puede mantenerse en los mismos tubos de recogida si los eyaculados no están demasiado contaminados con uratos, orina, heces o sangre.

En todos los casos en que deba diluirse el semen la solución más simple es proceder a su recogida directamente en las ampollas que contienen el diluyente previo y correctamente dosificado.

La inseminación propiamente dicha puede realizarse después con ayuda de una jeringa graduada provista de una cámara adecuada. En este caso, es difícil aplicar la dosis precisa y además el uso de la misma cánula puede provocar la difusión incontrolada de gérmenes patógenos.

Por ello, es preferible utilizar distribuidores automáticos provistos de materiales desechables. Estos distribuidores permiten repartir el semen en unas pajuelas calibradas con una capacidad de 1.2 ml, las cuales se utilizan por medio de una pistola de inseminación lo que permite que las dosis de semen aplicadas sean precisas y ajustables dentro de una amplia gama.