

PROCESO DE ELABORACIÓN DE DOSIS Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL

Obtención del Semen



La extracción del semen se realiza de verracos seleccionados previamente en función del número de dosis pedidas de cada raza, del ritmo de recogida y del historial de cada macho facilitado mediante registros informatizados. Dado que los verracos se encuentran alojados en cuadras con barrotes que les permita ver el resto de los animales y todo lo que está pasando en la nave, y salvo algunas excepciones, no es necesario sacar al verraco para que se vaya estimulando, lo que permite ahorrar tiempo. A pesar que los cerdos ibéricos son más problemáticos para la extracción del semen (sobretudo en los entrenamientos de monta y la estimulación previa al salto), la experiencia y la paciencia de nuestros técnicos permiten extraer semen de cerdos ibéricos para satisfacer cualquier demanda que se produzca.



La recogida del semen se realiza dentro de la propia cuadra del verraco utilizando el método de doble guante (uno para la limpieza previa y otro para la extracción del semen propiamente dicho). Una vez que el verraco sube al potro, en primer lugar se vacía el saco prepucial donde se acumulan restos de orina y semen (fuente importante de contaminación). En segundo lugar, y una vez que el verraco se excita y exterioriza el pene, se realiza la estimulación mediante presión con la mano, adaptando los dedos al tirabuzón sin dañar el animal. Una vez que el verraco exterioriza completamente el pene, hay que mantener este último firme y estimularlo de vez en cuando mediante suaves movimientos de los dedos, para provocar la eyaculación. Normalmente durante la eyaculación puede haber tres tipos de fracciones:

- Fracción pre-espermática: es la primera emisión del eyaculado y su función principal es la de lubricar la uretra. Normalmente es transparente y suele tener una carga

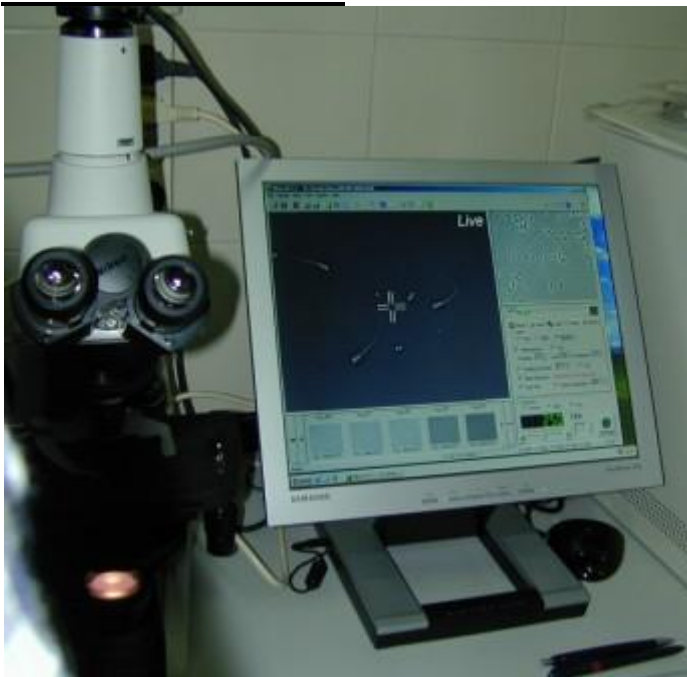
contaminante, por lo cual no se recoge esta fracción.

- Fracción rica de espermatozoides de color lechoso: Viene a continuación de la primera y sale rápidamente con alto número de espermatozoides y es la fracción que hay que recoger.

- Fracción post-espermática: Llamada también fracción pobre o acuosa: es de transparente y con muy bajo número de espermatozoides. Esta fracción no se recoge para mantener una muy buena calidad del semen.

Señalamos que normalmente el volumen de un eyaculado es de unos 300 ml de los que entre 80 y 150 ml suelen ser de fracción espermática buena.

Contrastación del semen



Tanto para la inseminación artificial como para los trabajos de investigación, los métodos de valoración de semen, han conocido un desarrollo espectacular para poder estimar con mayor precisión la fertilidad de los machos reproductores. El desarrollo e incorporación de nuevas tecnologías denominadas Tecnologías de Reproducción Asistida (TRA), tiene un interés creciente dentro de los sistemas de producción porcina. La contrastación del semen constituye un elemento imprescindible en la realización de dosis seminales de calidad, ya que permite detectar problemas de infertilidad o subfertilidad de los machos, producida por diversos factores que afectan a la calidad seminal.

Una vez finalizada la extracción del semen, se retira el filtro del vaso de recogida en el pre-laboratorio, se identifica la muestra (raza, macho y operario) y se manda al laboratorio para proceder a su valoración. Toda la información del eyaculado se introduce en el programa de gestión y análisis de datos del centro. La determinación de la calidad seminal así como del número de dosis se realizan mediante un soporte informático integrado que está supervisado por un especialista en biotecnología seminal. El empleo del programa informático es muy importante porque evita errores y permite trabajar de forma segura y objetiva. Además, el programa informático ofrece otras posibilidades de gestión que permiten la organización del trabajo del centro y el acceso a cualquier tipo de información o historial de cualquier animal.

En nuestro centro de inseminación, el análisis de semen consta del estudio rutinario de

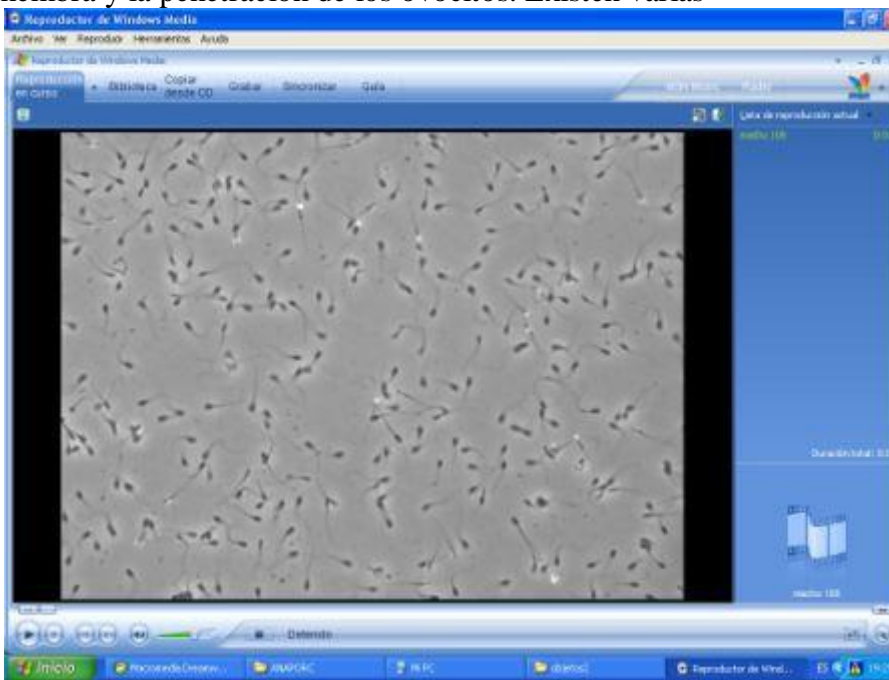
los siguientes parámetros:

- **Color:** se verifica si el color del semen es normal (blanquecino nítido sin la presencia de otros tonos, como rojizo, marrón, o amarillento). La presencia de colores atípicos puede ser debida a la presencia de alteraciones patológicas en aparato genital del verraco en cuestión. A los eyaculados de color sospechoso, se lo aplica el test de urea o de detección de sangre antes de su procesamiento.



- **Volumen:** Mediante una balanza de precisión, se determina el peso del eyaculado teniendo en cuenta el peso del vaso y el del diluyente de recogida (100 cc). Para el resto del trabajo se utiliza la relación peso/volumen 1/1. Este parámetro es muy importante de cara a determinar el número de dosis, por lo cual utilizamos siempre basculas de alta precisión y con certificado de calibración.

- **Motilidad:** La motilidad espermática es una característica importante del semen fértil ya que condiciona en gran parte el transporte espermático en el tracto genital de la hembra y la penetración de los ovocitos. Existen varias



técnicas para estudiar la motilidad del semen, pero la más utilizada y, a la vez, la más simple, es la valoración visual del porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de su movimiento.

Utilizando un microscopio de contraste de fase (40X), se observan varios campos de una gota plana de semen diluido colocada entre porta y cubre objetos atemperados a 37°C y se estiman tanto la motilidad individual (porcentaje de espermatozoides en movimiento) como la calidad de movimiento en una escala de 0 a 5 según el siguiente

baremo: 0: sin movimiento, 1: movimiento vibratorio sin desplazamiento de cabeza, 2: movimiento vibratorio con desplazamiento de cabeza, 3: movimiento progresivo y sinuoso, 4: movimiento progresivo rápido, 5: movimiento progresivo muy rápido. Señalamos que en nuestro centro los eyaculados por debajo de 75% de motilidad individual y/o con calidad de movimiento inferior a 3 no entran en el proceso de elaboración de dosis.

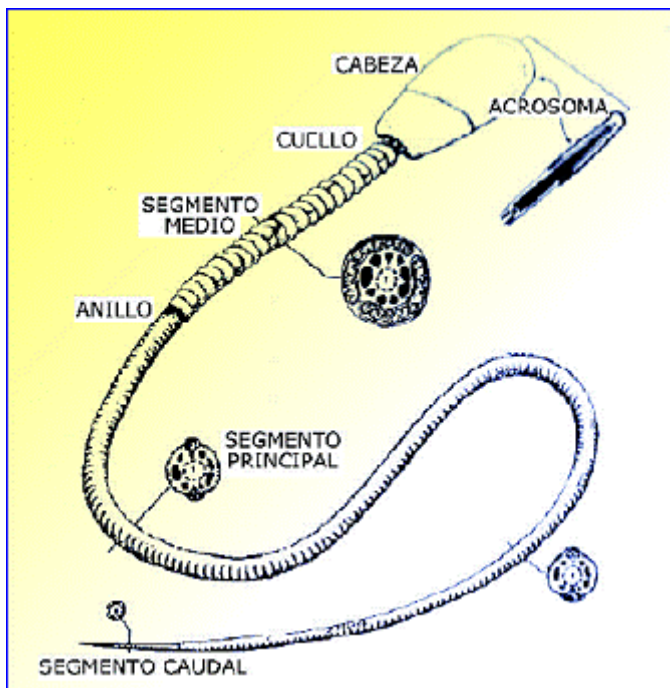
- **Aglutinación:** La evaluación de la aglutinación se realiza sobre la misma muestra de motilidad. Se determina el grado de acúmulos o de aglomeración de los espermatozoides en escala de 0 a 5 (siendo el 0 para las muestras buenas sin aglutinación y el 5 para las muestras muy malas con casi todos los espermatozoides aglutinados).

- **Contaminación:** Para los centros de inseminación la contaminación de los eyaculados es un factor muy importante a controlar. Aunque no se puede evitar al 100%, la contaminación de los eyaculados, sobre todo de origen bacteriano, se puede reducir considerablemente mediante la aplicación de protocolos de limpieza y sanidad. En nuestro centro de inseminación, gracias a los cuidados en todos los procesos de elaboración de dosis hemos logrado mantener significativamente muy baja la contaminación del semen. En este aspecto, aconsejamos lo siguiente:

- Vaciar bien el saco prepucial y limpiar el orificio prepucial con material limpio y desechable antes de cada recogida.
- Evitar la colección de la fracción pre-espermática y el gel post-eyaculatorio que pueden tener una alta carga microbiana.
- Utilizar la técnica de doble guante.
- Para cada recogida utilizar material nuevo, limpio y desechable.
- Separar el laboratorio de la nave de verracos con una sala (prelaboratorio) donde se prepara y se desecha el material de cada recogida.
- Evitar los verracos con problemas y signos infecciosos.
- Mantener limpias y desinfectadas la nave de los verracos y todas las instalaciones.
- Hacer controles bacteriológicos mensuales o trimestrales tanto para el semen como para los distintos puntos del proceso de elaboración de dosis. El agua utilizada en el laboratorio y la de los verracos deben estar analizadas periódicamente.
- La limpieza y sanidad del área, equipo y material de laboratorio debe de formar parte del protocolo de "mínima contaminación.
- Alojjar los machos individualmente en suelos no sólidos, secos y limpios.
- Utilizar ropa especial y limpia según el puesto de trabajo.
- Evitar la contaminación viral de los eyaculados evitando la infección de los animales mediante la aplicación de un plan sanitario con un programa de bioseguridad, análisis serológicos y vacunación.

- **Concentración:** La concentración del eyaculado es un parámetro cuantitativo muy importante ya que determina en gran parte el número de dosis a realizar. Dado su importancia en el proceso de elaboración de dosis, y aunque en otros centros utilizan el método de fotocolorimetría debidamente a su sencillez y rapidez, en nuestro centro utilizamos el método de recuento con la cámara de Bürker asistido mediante el programa informática de gestión. La elección de este método se debe a su gran exactitud ya que con los espectrofotómetros, que normalmente están ajustados con cámaras de recuentos, la variación de la composición del eyaculado (proteínas del plasma, presencia de gotas citoplasmáticas, de células de descamación, contaminación, etc.) puede inducir

errores importantes en la determinación de la concentración espermática. El uso de la cámara de Bürker necesita más tiempo, pero ofrece mayor exactitud cuando se utiliza correctamente (tomar la muestra de un eyaculado bien homogenizado, ajustar bien el cubreobjetos a la cámara, utilizar una pipeta graduada para llenar el retículo de la cámara por claridad, realizar la lectura por lo menos en 40 cuadros de la cámara, etc.) Los datos del recuento detallado (tipificando las células buenas y las que presentan morfoanomalías) se pasan automáticamente al ordenador donde se procesa la información teniendo en cuenta la motilidad y el porcentaje de formas anormales para determinar el número de dosis. El programa informático está diseñado para que no salga ninguna dosis por debajo de 3.500 millones de espermatozoides útiles (con buena motilidad y sin formas anormales), lo que nos permite ofrecer a nuestros clientes dosis de buen nivel de bioseguridad y con altos indicios reproductivos.



- Formas Anormales y

Acrosomas: El análisis de morfoanomalías del semen en nuestro centro se realiza también durante el recuento de células espermáticas para la concentración. De este modo nos aseguramos en poco tiempo de la calidad del semen antes de realizar su dilución. Se considera como espermatozoide anormal, cualquier célula que presenta una forma atípica de la normal, tanto a nivel de la cabeza, tracto intermedio o cola. También estudiamos la presencia de la gota citoplasmática (indicador del grado de madurez) distinguiendo las gotas

proximales de las distales. Los eyaculados por encima de 25% de morfoanomalía están desechados y no entran en el proceso de dilución y elaboración de dosis.

En paralelo y en otro puesto de trabajo se determina el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal. El acrosoma es una estructura que juega un papel determinante en el proceso de fecundación, ya que contiene las enzimas necesarias para la penetración del cumulus y de la zona pelúcida del óvulo, por lo tanto es fundamental su valoración. En un espermatozoide cuyo acrosoma está intacto se distinguen tres regiones claramente diferenciadas: *la región acrosomal* (en el borde apical), *la zona postacrosomal* y el *segmento ecuatorial*. La valoración de la integridad acrosomal se puede realizar con microscopio de contraste de fases, mediante la simple fijación de la muestra con glutaraldehído al 2%.

La determinación del estado acrosomal se justifica por la importancia del acrosoma en el proceso de fecundación por un lado, y por su susceptibilidad de sufrir alteraciones durante los procesos de dilución y conservación.

- Test de resistencia osmótica:

- **Técnicas de tinción**