Evaluación de la inseminación artificial poscervical *vs* cervical en los parámetros reproductivos

ANDRÉS SUÁREZ USBECK[1], OLGA MITJANA NERÍN[1], M. TERESA TEJEDOR[2], CRISTINA BONASTRE[1], DAVID MOLL[3], JUAN COLL[4], CLAUDIA BALLESTER[5] Y VICTORIA FALCETO RECIO[1].

[1]*Departamento de Patología Animal, Área de Reproducción y Obstetricia, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.*
[2]*Departamento de Anatomía, Embriología y Animal Genética Animal, CIBERCV, Área de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.*
[3]*Granja San Pedro (Cuarte SA), Plasencia, Zaragoza.*
[4]*Granja Coll S.L, Fonz, Huesca.*
[5]*Granja Mapi, Fabara, Zaragoza.*

RESUMEN

La eficacia de la inseminación artificial poscervical (IAPC) en cerdas multíparas está bien demostrada, pero solo hay unos pocos estudios sobre la IAPC en nulíparas. El objetivo principal de este estudio fue comparar los parámetros reproductivos, la frecuencia de las incidencias y la duración del procedimiento de la inseminación cervical (IAC) y la inseminación poscervical en cerdas nulíparas. Inicialmente, se asignaron al azar 320 y 324 cerdas nulíparas a los grupos IAPC e IAC, respectivamente. Las hembras presentaban 255-270 días de edad, 150 ±5,0 kg de peso vivo y 2 celos detectados previamente. Se realizaron de 2 a 4 inseminaciones por cerda. La tasa de éxito de penetración hasta el cuerpo del útero por parte de IAPC fue del 92,25%. Las cerdas en las que en alguna de las inseminaciones hubo dificultad en el paso de la sonda (22,8%) se eliminaron del estudio, quedando 247 cerdas nulíparas en el grupo IAPC. El reflujo se observó con menos frecuencia en el grupo IAPC que en IAC (5,70% frente a 8,20% respectivamente, P <0,05). Las diferencias significativas fueron detectadas para la duración media del procedimiento de inseminación artificial (IA); el grupo IAPC mostró una duración más corta que IAC (142,44 ± 68,69 s *vs*. 305,61 ± 83,16 s; P <0,001). Los grupos IAPC e IAC mostraron valores similares para las tasas de fertilidad y prolificidad (P> 0,05). Por lo tanto, la aplicación del método IAPC en cerdas nulíparas no afectaría a su rendimiento reproductivo.

Palabras clave: Inseminación artificial, poscervical, fertilidad, prolificidad, nulíparas.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la mayoría de las granjas de cerdos en todo el mundo utilizan la inseminación cervical (IAC) en el manejo reproductivo de las cerdas nulíparas (*Fitzgerald et al., 2008; García-Vázquez et al., 2019*). Cuando se usa este método, se aplican entre 2 a 3 dosis de semen por estro, que a su vez contienen de 2-4x10^9 células espermáticas en un volumen de 70-100 ml, almacenadas a 17° C durante un período máximo de 3-7 días según el diluyente utilizado. El número de dosis seminales obtenidas por eyaculado en este caso está limitado a 20-25 dosis (*Fitzgerald et al., 2008; Wilson, 2012; Hernández Caravaca, 2015*).

El primer trabajo de campo publicado usando la IAPC fue realizado por Watson y Behan en 2002, quienes obtuvieron resultados similares a los obtenidos con el método tradicional o IAC. La inseminación IAPC se ha planteado como una nueva técnica para depositar semen en el cuerpo uterino utilizando un número reducido de espermatozoides, sin una disminución en la productividad (*Bennemann et al., 2004; Serret et al., 2005; Roca et al., 2011*), probando nuevos modelos de catéter y sondas (*Martínez et al., 2005; Kirkwood y Kauffold, 2015; Ausejo et al., 2017; Ulguim et al., 2018; Llamas-López et al., 2019*). Con esta técnica, los verracos en los centros de inseminación artificial (IA) mejorarán su eficiencia genética (*Bortolozzo et al., 2008; Sbardella et al., 2014; Knox, 2016*), debido a que la IAPC implica la inseminación con dosis que contienen 1,5-0.5x10^9 espermatozoides en un volumen de 30-60 ml, y que cada eyaculado puede producir hasta 60 dosis seminales. Otro punto que se aporta es que la IAPC produce tamaños de camada y tasas de parto similares a las de la IAC, aunque los objetivos principales de la IAPC son el progreso genético eficiente, la reducción del reflujo durante la inseminación y la disminución de la duración del procedimiento de IA (*Bennemann et al., 2004; Nogueira et al., 2006 ; Wilson, 2012; Falceto, 2018; Suárez-Usbeck et al., 2019*).

Las cerdas nulíparas juegan un papel importante en el censo de las granjas; representando el 18% del grupo de partos, siendo responsables de aproximadamente el 13% del total de lechones nacidos (*Ternus et al., 2017*). El uso de IAPC en cerdas multíparas está bien establecido, pero solo hay unos pocos estudios sobre IAPC tanto en cerdas primíparas como en cerdas nulíparas. Hernández-Caravaca *et*

al. (2012) encontraron que los catéteres IAPC útiles para las cerdas multíparas podrían usarse en solo el 25% de las cerdas nulíparas. Por lo tanto, se necesitan alternativas para implementar o modificar IAPC en cerdas nulíparas, siendo los factores limitantes más importantes para IAPC en cerdas nulíparas, su tracto reproductivo más pequeño y la necesidad de una buena capacitación del técnico en el uso de catéteres específicos para IAPC (*Levis et al., 2001; Ausejo et al., 2017; Hernández-Caravaca et al., 2017; Ulguim et al., 2018; Suárez-Usbeck et al., 2019*).

El objetivo principal de este estudio fue comparar los efectos de los métodos IAC y IAPC sobre la fertilidad, la tasa de partos y los parámetros de prolificidad en cerdas nulíparas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Declaración ética

Este estudio cumplió con las directrices de la Directiva del Consejo 2008/120/CE que establece estándares mínimos para la protección de cerdos y la Directiva 2010/63 / UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos. Todos los procedimientos del experimento se realizaron de acuerdo con los preceptos del bienestar animal y aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (protocolo No. PI31 / 18).

Animales

Este experimento se llevó a cabo bajo condiciones de producción estándar de España entre 2016 y 2018 en tres granjas de cerdas reproductoras ubicadas junto a Fonz (Huesca), Plasencia de Jalón (Zaragoza) y Caspe (Zaragoza). Se utilizaron un total de 644 cerdas nulíparas en el estudio; las cerdas nulíparas tenían 255-270 días de edad, pesaban 150 ± 5 Kg (SD) y 2 celos detectados previamente. Fueron asignados al azar al grupo de tratamiento (grupo IAPC; n=320) o al grupo control (grupo IAC; n=324). Las cerdas nulíparas se alojaron en corrales individuales (0,65 x 2 m). Fueron alimentados con una dieta comercial dos veces al día. Las nulíparas se trataron con altrenogest (*Regumate®*, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, Estados Unidos) durante 18 días. El agua estaba disponible *ad libitum*.

Recolección del semen

El semen se obtuvo de 35 diferentes verracos Pietrain (*Semen Cardona; CIA San Pedro, Cuarte S.A.; CIAR*) una vez a la semana mediante la técnica de mano enguantada y se filtró para eliminar la tapioca. El número promedio de espermatozoides se evaluó mediante un patrón *Blaubrand® Bürker* de la cámara de contaje *Brand®* (*Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, EE. UU.).* Su motilidad, aglutinación y anomalías se analizaron utilizando el *software ISAS Psus®* (*Proiser R+D, Paterna, España*). Solo se utilizaron eyaculados que cumplían con los requisitos mínimos (motilidad> 80% y anomalías totales <25%). Inmediatamente después de la evaluación, cada eyaculado se diluyó completamente en un diluyente comercial a 37°C (*Vitasem®*, Magapor, Ejea de los Caballeros, España) y se almacenó en una bolsa que contenía 1,5 x 10^9 espermatozoides por 45 ml (usado para IAPC) o 3 x 10^9 espermatozoides por 90 ml (utilizados para IAC). Las dosis se almacenaron a 15-18° C durante 72 h.

Inseminaciones

La detección del estro se realizó dos veces al día utilizando verracos maduros sexualmente mediante la técnica de detección del reflejo de inmovilidad y la observación del resto de síntomas de estro (edema de la vulva, gruñidos, orejas erectas, etcétera). Las nulíparas se inseminaron con la primera dosis de semen en el momento de la detección del ›

TABLA 1.
Frecuencias de problemas para cada inseminación en los grupos IAC y IAPC

Problemas	Grupos		P-valor
	IAC (n=970 IA)	IAPC (n=853 IA)	
Reflujo (%)	8,20 (80/970)	5,70 (49/853)	0,047
Sangrado (%)	0,80 (8/970)	1,40 (12/853)	0,334

IAC: Inseminación artificial cervical, IAPC: Inseminación artificial postcervical. P<0,05

TABLA 2.
Porcentaje de fertilidad, tasa de partos, parámetros de prolificidad y tiempo medio de cada inseminación.

Variables	Grupos		P-valor
	IAC (n=324 nulíparas)	IAPC (n=247 nulíparas)	
Fertilidad (%)	91,40 (296/324)	92,30 (228/247)	0,798
Tasa de partos (%)	85,80 (278/324)	89,10 (219/247)	0,780
Nacidos totales/camada	18,28 ±4,43	18,52 ±4,29	0,538
Nacidos vivos/camada	16,20 ±3,94	16,56 ±4,09	0,325
Nacidos muertos /camada	1,67 ±1,76	1,59 ±1,83	0,475
Momificados/camada	0,41 ±0,79	0,39 ±0,77	0,702
Tiempo medio de cada IA (s)	305,61 ±83,16	142,44 ±68,69	<0,001

IAC: inseminación artificial cervical; IAPC: Inseminación artificial postcervical. P<0,05

celo y las posteriores inseminaciones con intervalos de 12-24 horas a lo largo de la duración del estro. El número medio de inseminaciones fue de 2,93 ± 0,29 (DE) (mínimo: 2 y máximo: 4).

Las cerdas del grupo de control (IAC) se inseminaron con la presencia del verraco, y el semen se depositó en la porción craneal del cuello uterino, utilizando el catéter de punta de espuma para cerdas nulíparas (*Magaplus®, Magapor, Ejea de los Caballeros, España*). Para las cerdas IAPC, las inseminaciones se realizaron sin la presencia del verraco, utilizando una sonda IAPC específica para las cerdas nulíparas (*Magaplus N®, Magapor, Ejea de los Caballeros, España*) y, como guía, el catéter de punta de espuma anteriormente mencionado. Se registró la duración de los procedimientos de IA. La presencia de incidencias como sangrado o reflujo en las inseminaciones se registraron en los grupos IAC y IAPC.

Diagnóstico de gestación

De 18 a 24 días después de la inseminación, el retorno al estro se evaluó mediante el reflejo de inmovilidad con presencia del verraco. La preñez se diagnosticó mediante ecografía transabdominal (*Future-1®, Inserbo, España*) 28 días después de la inseminación. Las repeticiones, abortos y muertes después de la confirmación de la preñez fueron registradas en la base de datos. Los parámetros reproductivos (fertilidad y tasa de partos; lechones nacidos vivos, nacidos vivos, nacidos muertos y momias por camada), así como los problemas durante la IA, se registraron para los grupos IAC y IAPC.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando *SPPSS v. 22*. Las variables cualitativas se analizaron mediante tabulación cruzada y los porcentajes se compararon mediante la prueba de la χ^2 de *Pearson*. Las variables cuantitativas se analizaron utilizando el modelo lineal general (MLG). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una p<0,05. La duración promedio de las inseminaciones se calcularon para cada inseminación como su media; La prueba de *Breslow* se utilizó para las comparaciones entre grupos.

RESULTADOS

La tasa de éxito de paso de la sonda IAPC a través del cuello uterino fue del 92,25% (869/942 IAPC). Las cerdas nulíparas que no permitieron el paso de la sonda IAPC en alguna de las inseminaciones realizadas durante el estro (22,8%: 73/320 IAPC), fueron eliminadas del estudio. Finalmente, 247 cerdas nulíparas estaban en el grupo IAPC. El número total de IA realizadas en los grupos de IAC y IAPC fue de 970 y 853, respectivamente. En el grupo IAPC, hubo dificultades en el paso de la sonda en el 4,5% (38/853). La *Tabla 1* muestra la frecuencia de reflujo y sangrado sobre el total de IA realizadas en ambos grupos; el reflujo fue menos frecuente en el grupo de IAPC (P<0,047). La *Tabla 2* muestra los parámetros de fertilidad y prolificidad y la duración media del procedimiento de AI para ambos grupos. Solo

se detectaron diferencias significativas para la duración media de las inseminaciones (P<0,001); IAPC mostró un tiempo más corto.

DISCUSIÓN

La técnica de IAPC representa una parte importante del desarrollo en biotecnología reproductiva en las granjas porcinas en las últimas décadas. Su uso se ha extendido por todo el mundo, aunque su aplicación está limitado principalmente a cerdas multíparas. Desde que Hancock en 1959 describió y usó métodos intrauterinos no quirúrgicos de inseminación por primera vez en cerdas multíparas mediante endoscopios, se han empleado diversos catéteres y sondas para este propósito, aunque estas técnicas muestran ciertas limitaciones, incluyendo su inadecuación para la aplicación en primerizas o nulíparas (*Hernández Caravaca, 2015; Hernández-Caravaca et al., 2017; Llamas-López et al., 2019*). En el presente estudio, el porcentaje de éxito en la introducción de la sonda para realizar la IAPC en nulíparas ha sido del 92,25%, un alto porcentaje en comparación con las cifras habituales.

Por lo general, los porcentajes de éxito son del 95% en cerdas multíparas; 85% en primíparas y 75% en nulíparas (*Sbardella et al., 2014; Bortolozzo et al., 2015; Hernández-Caravaca et al., 2017*). Este resultado difiere de la recomendación de no usar la IAPC para las nulíparas de Levis (2001) y Dallanora (2004), pero corrobora los resultados de Sonderman (2016) y Ternus (2017), quienes concluyeron que la IAPC puede ser realizada con éxito en cerdas nulíparas. Durante los últimos años, se utilizaron nuevos catéteres y sondas, desarrollados para evitar lesiones y mejorar los protocolos de IAPC en granjas comerciales (*García-Vázquez et al., 2019*).

El reflujo fue el problema más frecuentemente observado, aunque su frecuencia fue baja (5,70%). Ausejo *et al.* (2017), Dominiek *et al.* (2011) y Hernández-Caravaca *et al.* (2017) reportaron resultados similares en cerdas multíparas y cerdas nulíparas. El reflujo ocurre debido a muchos factores, pero generalmente es por una aplicación incorrecta de la sonda, que causa dificultad de paso y torsión de la parte interna del catéter que permite el retorno del semen (*Ausejo et al., 2017; Ternus et al., 2017; García-Vázquez et al., 2019*). La mayoría de los casos de reflujo ocurrieron cuando se aplicó la tercera dosis de semen, por lo que podrían estar relacionadas con fallos en la detección del final del celo y la realización de inseminaciones forzadas.

Para el grupo IAPC, solo se observaron unos pocos casos de sangrado (1,40%), y no hubo diferencias significativas entre los grupos IAC e IAPC (P= 0,334). Rozeboom *et al.* (2014), Serret *et al.* (2005) y Llamas-López *et al.* (2019) desaconsejan la IAPC en nulíparas; dado el pequeño tamaño del tracto reproductivo, que causaría lesiones en el cuello uterino. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que el uso de una sonda específica por parte de un personal calificado no causa lesiones en el cuello uterino de las nulíparas, confirmando los resultados de Ausejo *et al.* (2017).

El tiempo medio requerido para realizar los diferentes procedimientos de IA fue de 305,61 s para IAC y 142.44 s para IAPC. Ternus (2017) obtuvo resultados similares: los tiempos medios por IA fueron 242 y 88 segundos para IAC y IAPC, respectivamente (relación: 242/88 = 2,75). Sin embargo, en nuestro estudio, el número de lechones nacidos y la tasa de nacimientos no fueron influenciados por la duración de la inseminación o por el tratamiento.

En cuanto a los parámetros reproductivos, estos se corroboran con los resultados de Sonderman (2016) y Ternus (2017); los cuales no encontraron diferencias significativas para la fertilidad y la tasa de parto entre los grupos IAC y IAPC. Tampoco se encontraron diferencias estadísticas para los parámetros de prolificidad (nacidos totales, nacidos vivos, nacidos muertos y momificados) entre estos dos grupos; Fitzgerald *et al.* obtuvieron resultados similares (2008); Hernández-Caravaca *et al.* (2012) y Hernández-Caravaca (2015) en cerdas multíparas, y por Sbardella (2014) en primerizas nulíparas. Nuestros resultados muestran que la técnica IAPC no compromete el rendimiento reproductivo en cerdas nulíparas.

CONCLUSIONES

La técnica IAPC en cerdas nulíparas, realizado con dosis de semen que contienen $1{,}5 \times 10^9$ espermatozoides por cada 45 ml, permite resultados reproductivos y de prolificidad similares a los observados con la técnica de IA cervical (dosis que contienen $2{,}5 \times 10^9$ espermatozoides en 90 ml). ■

REFERENCIAS

Araújo ÉB, Paulino E, Helena A, Lopes G, Macedo GG, Antônio T, Paula R De, 2009. Reproductive performance of sows submitted to intrauterine insemination. *Rev. Bras. Zootec.* 3598, 1460–7.

Ausejo R, Mendoza N, Dahmani Y, Mitjana O, Falceto MV, 2017. Effect of incidents associated to post-cervical artificial insemination on reproductive. *Bulg. J. Vet. Med.* 21, 1311–477. https://doi.org/10.15547/bjvm.1031.

Bennemann PE, Milbradt E, Diehl GN, Weber D, Schmidt ACT, Bernardi, ML, 2004. Reproductive performance of sows submitted to intrauterine insemination at different pre-ovulatory intervals; 3, 106–10.

Bortolozzo FP, Maria A, Goldberg G, Wentz I, 2008. How far is it possible to reduce the number of spermatozoa after intra- cervical insemination in swine without compromising fertility? *Acta Sci. Vet.* 36, 17–26.

Bortolozzo FP, Menegat MB, Mellagi APG, Bernardi ML, Wentz I, 2015. New Artificial Insemination Technologies for Swine. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 80–4. https://doi.org/10.1111/rda.12544.

Dallanora D, Mezalira A, Katzer LH, Bernardi ML, 2004. Reproductive performance of swine females inseminated by intrauterine or traditional technique. *Pesq. agropec. Bras;* 39, 815–19.

Dominiek M, Alfonso LR, Tom R, 2011. Artificial Insemination in Pigs. *In-Tech* 79–94.

Fitzgerald RF, Jones GF, Stalder KJ, 2008. Effects of intrauterine and cervical artificial-insemination catheters on farrowing rate and litter size. *J. Swine Heal. Prod.* 16, 10–15.

García-Vázquez FA, Mellagi APG, Ulguim RR, Hernández-Caravaca I, Llamas-López PJ, Bortolozzo FP, 2019. Post-cervical artificial insemination in porcine: The technique that came to stay, *Theriogenology*, doi: https://doi.org/10.1016/j. theriogenology.2019.02.004.

Hernández-Caravaca I, 2015. Productive output of post-cervical insemination in porcine. Study of sperm selection in the female genital tract through backflow analysis. Dr. Diss. Universidad de Murcia.

Hernández-Caravaca I, Izquierdo-Rico MJ, Matás C, Carvajal JA, Vieira L, Abril D, Soriano-Úbeda C, García-Vázquez FA, 2012. Reproductive performance and backflow study in cervical and post-cervical artificial insemination in sows. *Anim. Reprod. Sci.* 136, 14–22. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.007.

Hernández-Caravaca I, Llamas-López PJ, Izquierdo-Rico MJ, Soriano-Úbeda C, Matás C, Gardón JC, García-Vázquez FA, 2017. Optimization of post-cervical artificial insemination in gilts: Effect of cervical relaxation procedures and catheter type. *Theriogenology* 90, 147–52. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.027.

Kirkwood RN, Kauffold J, 2015. Advances in Breeding Management and Use of Ovulation Induction for Fixed-time AI. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 85–9. https://doi.org/10.1111/rda.12524.

Knox RV, 2016. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology* 85, 83–93. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.009.

Levis DG, Burroughs S, Williams S, 2001. Use of intra-uterine insemination of pigs: Pros, cons & economics. *Fac. Pap. Publ. Anim. Sci.* 618, 1–20.

Llamas-López PJ, López-Úbeda R, López G, Antinoja E, García-Vázquez FA, 2019. A new device for deep cervical artificial insemination in gilts reduces the number of sperm per dose without impairing final reproductive performance. *J Anim Sci Biotechnol* 1, 1–9.

Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL, 2005. An update on reproductive technologies with potential short-term application in pig production. *Reprod. Domest. Anim.* 40, 300–9. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00593.x

Nogueira G, Wald D, Filha A, Kummer R, Koller F, Lourdes M, Wentz I, Pandolfo F, 2006. Nova pipeta para inseminação intra–uterina em suínos New pipette for intrauterine insemination in pigs 179–85.

Roca J, Parrilla I, Rodríguez-Martínez H, Gil MA, Cuello C, Vázquez JM, Martínez EA, 2011. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 79–83. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01828.x

Rozeboom KJ, Troedsson MHT, Molitor TW, Crabo BG, 2014. The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. *J. Anim. Sci.* 77, 2201–6. https://doi.org/https://doi.org/10.2527/1999.7782201x

Sbardella PE, Ulguim RR, Fontana DL, Ferrari CV, Bernardi ML, Wentz I, Bortolozzo FP, 2014. The post-cervical insemination does not impair the reproductive performance of primiparous sows. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 59–64. https://doi.org/10.1111/rda.12224.

Serret CG, Alvarenga MVF, Cória ALP, Dias CP, Corcini CD, Corrêa MN, Deschamps JC, 2005. Intrauterine artificial insemination of swine with different sperm concentrations, parities, and methods for prediction of ovulation. *Anim. Reprod. Sci.* 9, 250–6.

Suárez-Usbeck A, Mitjana O, Tejedor MT, Bonastre C, Moll D, Coll J, Falceto M, 2019. Post-cervical compared with cervical insemination in gilts: reproductive variable assessments. *Animal Reproduction Science*, 106207.

Ternus EM, Vanz AR, Lesskiu PE, Preis GM, Serafini L, Consoni W, Traverso SD, Cristani J, 2017. Reproductive performance of gilts submitted to post-cervical artificial insemination. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 69, 777–84. https://doi.org/10.1590/1678-4162-9285.

Ulguim R, Vier CM, Betiolo FB, Sbardella PE, Bernardi ML, Wentz I, Mellagi AP, Bortolozzo FP, 2018. Insertion of an intrauterine catheter for post-cervical artificial insemination in gilts. *Semina: Ciências Agrárias*, *39*(6), 2833-88. https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n6p2883.

Watson PF, Behan JR, 2002. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology* 57, 1683–93.

Wilson ME, 2012. Differences in Mating Between a Boar, Traditional Artificial Insemination and Post Cervical Insemination, in: London Swine Conference. pp. 45–53.