



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



MASTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA
ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**Niveles de cortisol en saliva de cerdas
reproductoras durante el destete, el estro y
la inseminación y su relación con la
fertilidad**

Tesis de Master
Valencia, Julio 2011

Gerald Muça

Directores:

Dr. Jordi Roca Aleu

Dra. Inmaculada Parrilla Riera

Universidad de Murcia





UNIVERSIDAD DE MURCIA

El trabajo experimental de la presente Tesis de Máster ha sido realizado en los laboratorios del Grupo de Investigación "**Reproducción Animal**" de la Universidad de Murcia.



JORDI ROCA ALEU, Catedrático del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia e **INMACULADA PARRILLA RIERA** contratada “Ramón y Cajal” de la Universidad de Murcia,

INFORMAN:

Que **Gerald Muça**, alumno del **Máster Interuniversitario en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción**, ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis de Máster titulada “**niveles de cortisol en saliva de cerdas reproductoras durante el destete, el estro y la inseminación y su relación con la fertilidad**” en las instalaciones del grupo de investigación “Reproducción Animal” de la Universidad de Murcia a lo largo del curso académico 2010-2011.

Murcia a treinta de junio de 2011

“Este estudio experimental ha sido financiado por CICYT-GAN (AGL2008-04127), Madrid y GERM (04543/07), Fundación Séneca, Región de Murcia”.

DEDICATORIA

EN RECUERDO Y HONOR DE MI ABUELA Y MI SEGUNDA MADRE **SABRIE CEKA**, POR ENSEÑARME Y CUIDARME EN LOS PRIMEROS PASOS DE MI VIDA, ES MUY DIFÍCIL ENCONTRAR LAS PALABRAS PARA DESCRIBIR LAS DIMENSIONES DEL AFECTO Y EL RESPETO QUE SIENTO POR ESTA PERSONA. HACE TIEMPO QUE NO LA VEO, QUE JAMÁS TENDRÉ LA POSIBILIDAD DE VERLA Y ABRAZARLA OTRA VEZ. LA TENDRÉ SIEMPRE EN MIS RECUERDOS POR LA SINCERIDAD, SU CARÁCTER Y PERSONALIDAD QUE TENIA, QUE HOY EN DÍA HAY POCAS PERSONA QUE LO TIENEN, ME FALTARÁ PARA TODO EL RESTO DE MI VIDA

AGRADECIMIENTOS.

A mi familia, a mi madre **Nazmie** y a mi hermano **Ardit**, en especial a mi madre, que es una de las personas más especiales que he conocido en esta vida, por el apoyo sin límite que me ha dado y sin ella no sé donde sería hoy, perdonarme por todos los problemas y le he provocado.

Al **Dr. D. Jordi Roca Aleu**, director de la tesis, por la acogida y la confianza que dio en mi, por su tiempo y paciencia que ha mostrado conmigo durante todo este tiempo. Por enseñarme los primeros pasos de un trabajo experimental.

Al codirectora de la tesis, **Dra. Inmaculada Parrilla Riera**, por el soporte durante todo este tiempo y por sus consejos y por la gran ayuda a la hora darle la forma definitiva la tesis.

Al **Dr. D Emilio Martínez García**, jefe del Área de Reproducción y Obstetricia, por permitirme ser parte de este grupo de investigación que dirige con un gran carisma, que dan cuenta de una gran persona y excelente profesional.

A mis exprofesores de carrera, **Prof. Petriti, Prof, Pascali y Prof, Luigi** por la suerte que tuve de formarme profesionalmente con ellos, ahora que este tiempo ya ha pasado puedo recordar y comprender muchas cosas y salgo en conclusión que sentiré siempre culpable y en debido con ellos para no dedicarle y mas intención y respeto, estas excelentes personas en plan personal y profesional que es difícil que encontrare parecidos.

A todos los amigos del departamento, gracias por hacer de mi estancia una agradable experiencia y por el apoyo que me habéis dado para saltar los obstáculos de este trabajo y por compartir sus alegrías y logros. A **Dr. Jonatan y Carmen, gracias a Dr. Toñi, Dr. Xiomara Dr. Cristina y gracias a David, Miguel, Carolina, Jesus, Lola, Sonia y Maria José.**

A mis amigos de "**La Granja Veterinaria**", por todos los buenos momentos compartidos, por la amistad brindada, por los buenos momentos pasados y por soportarme durante este tiempo. A **Diego, Livia, Luis , Alma, Isis, Ernesto, Susana, Nayeli, Patricia, Kasia, Gustavo, Maribel, Victor.**

A **Mariano, Paco y Fina** por el soportamiento y por los buenos momentos que he pasado con ellos.

A **Antonio, Miguel** y su familia, por el apoyo y soportamiento que me han dado durante el desarrollo de esta experiencia.

Un agradecimiento particular por mi compañero de máster **Anthony Valverde**, por todos los momentos que hemos compartido, los momentos difíciles y buenos durante este periodo, sin olvidar a **Erika** durante el tiempo que le junto al nuestro camino, por los agradables momentos que hemos pasado y por una amistad sincera que hemos compartido.

A todos mis amigos que hice y conocí durante este máster, empezando por mis compatriotas, **Jonida, Fatmira, y Olgert**, y todos que conocí durante los primeros días de mi estancia en España, A **Carine, Rafia, Myriam, Amine, Fadi, Maged, Monie, Hatiche, Basim, Muhamed** por los agradables momentos que pase con ellos.

A los compañeros del master, **Mokhtar, Ayman, Virginia, Gabriel, Danelis, Rommel, Ronald, Alan, Rubén Mustafá y Aldemar**, por todos los momentos que hemos compartido durante este máster.

Y a los últimos pero no por la importancia, a mis compatriotas y mis campesinos, por todos los valores humanos y el carácter que tiene, pesar que no tengo ningún de vuestros características, lo se que soy uno de los peores entre vosotros, esto no me impide de ser eternamente orgulloso de nacer y pertenecer a este lugar mítico con todos los sentidos de la palabra.

INDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 2.1. ANTECEDENTES HISTORICOS Y ESTADO ACTUAL DE LA PRODUCCION PORCINA | 6 |
| 2.2 PAPEL DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL EN LOS SISTEMAS ACTUALES DE PRODUCCION PORCINA | 7 |
| 2.2.1. <i>La Inseminación Artificial y su importancia en la especie porcina.</i> | 7 |
| 2.2.2. <i>Nuevas técnicas de inseminación.</i> | 8 |
| 2.3. BIENESTAR ANIMAL Y EL ESTRÉS | 11 |
| 2.3.1. <i>El bienestar animal</i> | 11 |
| 2.3.2. <i>¿Qué es el estrés?</i> | 12 |
| 2.3.2.1. <i>La respuesta fisiológica al estrés. Importancia del eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA).</i> | 14 |
| 2.3.3. <i>Bienestar animal y estrés.</i> | 18 |
| 2.4. EFECTO DEL ESTRÉS SOBRE LA REPRODUCCION | 20 |
| 2.4.1. <i>Eventos endocrinos sobre la reproducción</i> | 20 |
| 2.4.2. <i>La ACTH exógena y la reproducción</i> | 21 |
| 2.4.3. <i>Estrés relacionado con la reproducción</i> | 21 |
| 2.4.5. <i>Estrés agudo y reproducción</i> | 24 |
| 2.4.6. <i>El estrés durante el destete</i> | 25 |
| 2.4.7. <i>El estrés durante la monta natural y la inseminación artificial</i> | 26 |
| 2.4.8. <i>El estrés durante la inseminación laparoscópica.</i> | 27 |
| 2.5. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS | 27 |
| 2.5.1. <i>El cortisol</i> | 27 |
| 2.5.2. <i>Métodos para evaluación del cortisol.</i> | 31 |
| 2.5.2.1. <u><i>Determinación del cortisol en sangre.</i></u> | 31 |
| 2.5.2.2. <u><i>La saliva como una alternativa viable para una evaluación objetiva de los niveles de cortisol.</i></u> | 32 |
| 2.5.2.3. <u><i>La varianza individual en la respuesta al estrés.</i></u> | 35 |
| CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS | 37 |
| 3.1. MATERIALES | 38 |
| 3.1.1. <i>Animales, alojamiento y alimentación.</i> | 38 |
| 3.2. MÉTODOS | 39 |
| 3.2.1. <i>Manejo reproductivo de las cerdas.</i> | 39 |
| 3.2.2. <i>Recogida y procesado de las muestras de saliva.</i> | 40 |
| 3.2.3. <i>Recogida de los eyaculados y preparación de dosis de inseminación</i> | 42 |
| 3.2.3. <i>Inseminación vía cervical.</i> | 43 |
| 3.2.4. <i>Inseminación por laparoscopia.</i> | 46 |
| 3.2.5. <i>Evaluación de la fertilidad</i> | 48 |
| 3.2.6. <i>Determinación de los niveles de cortisol.</i> | 48 |
| 3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS | 52 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS | 53 |
| 4.1. NIVELES EN SALIVA DE CORTISOL ANTES, DURANTE E INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE UN ESTRÉS AGUDO | 54 |
| 4.2. NIVELES DE CORTISOL EN SALIVA DESDE EL DESTETE HASTA DESPUÉS DE FINALIZAR EL ESTRO | 55 |
| 4.3. NIVELES EN SALIVA DE CORTISOL A LO LARGO DEL ESTRO | 55 |
| 4.4. INFLUENCIA DE LOS PROCEDIMIENTOS DE INSEMINACIÓN VÍA CERVICAL EN LOS NIVELES DE CORTISOL EN SALIVA..... | 56 |
| 4.5. INFLUENCIA DEL PROTOCOLO DE INSEMINACIÓN LAPAROSCÓPICA EN LOS NIVELES DE CORTISOL EN SALIVA..... | 59 |
| 4.6. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES SALIVARES DE CORTISOL Y LOS PARÁMETROS DE FERTILIDAD | 60 |
| CAPÍTULO V: DISCUSIÓN | 62 |
| CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES | 72 |
| CAPÍTULO VII: RESUMEN | 74 |
| RESUMEN..... | 75 |
| SUMMARY | 76 |
| RÉSUMÉ | 77 |
| CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA | 78 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. La composición del pienso para las cerdas. | 38 |
| Tabla 2. Composición del diluyente Beltsville Thawing Solution (BTS)..... | 43 |
| Tabla 3. Cantidades medias (\pm sem) de cortisol cuantificadas antes (15 min), durante y después (15 min) de las inseminaciones realizadas por vía cervical. | 59 |
| Tabla 4. Parámetros de fertilidad en cerdas inseminadas (IA) empleando diferentes procedimientos de inseminación. | 61 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Inseminación Convencional (IIC), tomado de Roca y cols. (2006) | 8 |
| Figura 2. Inseminación Post Cervical, tomado de Roca y cols. (2006)..... | 9 |
| Figura 3. Inseminación intrauterina- Profunda, tomado de Roca y cols. (2006) | 10 |
| Figura 4. Inseminación por Laparoscopia, tomado de Roca y cols. (2006)..... | 11 |
| Figura 5. El funcionamiento del eje HPA, adaptado de Kranendonk (2006)..... | 18 |
| Figura 6. Esquema del sistema de la evaluación del bienestar animal, adaptado de (Velarde y Dalmau, 2010). | 19 |
| Figura 7. La producción del cortisol, adaptado de Martin. (1985). | 28 |
| Figura 8. La estructura del cortisol (C ₂₁ H ₃₀ O ₅) obtenido de Citizendum. Enciclopedia en línea. (David E. Volk)..... | 28 |
| Figura 9. Cortisone/Cortisol transformación, adaptado por Martin. (1985). | 29 |
| Figura 10. Detección del estro mediante verraco en cerdas enjauladas. | 40 |
| Figura 11. Esponja utilizada para hacer de hisopo. | 41 |
| Figura 12. Colocación de la esponja en la varilla e hisopo preparado para su uso..... | 41 |
| Figura 13. Hisopo introducido en la boca de la cerda. | 41 |
| Figura 14. Colocación de la esponja en el tubo. | 42 |
| Figura 15. Tubos de saliva preparados para centrifugar y esponja en el interior del tubo. ... | 42 |
| Figura 16. Inseminación intra-cervical. Posición del extremo del catéter entre los pliegues del cuello uterino..... | 44 |
| Figura 17. Inseminación intra-uterina. Disposición del extremo del catéter tradicional de inseminación entre los pliegues del cuello uterino y de la cánula interna que alcanza la luz del cuerpo del útero. | 45 |
| Figura 18. Inseminación intra-uterina profunda. Disposición del extremo del catéter tradicional de inseminación entre los pliegues del cuello uterino y de la sonda interna que alcanza la profundidad de uno de los cuernos uterinos. | 46 |
| Figura 19. Inseminación por laparoscopia. Disposición del laparoscopio y de los puertos accesorios. | 47 |
| Figura 20. Inseminación por laparoscopia. Deposición de la dosis seminal en el interior de un oviducto. | 47 |
| Figura 21. Inmovilización de la cerda mediante la prueba del freno nasal y recogida de muestra de saliva durante dicha inmovilización..... | 49 |
| Figura 22. Recogida de muestra de saliva en una cerda durante la inseminación. | 51 |
| Figura 23. Recogida de muestra de saliva en una cerda después de la laparoscopia y todavía bajo los efectos de la anestesia. | 52 |
| Figura 24. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva de cerdas estabuladas en parques (nº = 11) y recogidas a los 15-20 min antes, durante y 15-20 min después de la sujeción del hocico mediante un lazo. Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea continua dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (±sem) a lo largo de los tres tiempos de cuantificación. a,b indica diferencias entre tiempos para P < 0'01..... | 54 |
| Figura 25. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva recogidas en cerdas (nº = 40) al destete, 24 h post-destete, durante el estro y 24 h post-estro. Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea | |

continua dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (\pm sem) a lo largo de los tres tiempos de cuantificación. a-c indica diferencias entre estadios fisiológicos para $P < 0'01$ 55

Figura 26. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva recogidas en cerdas ($n^{\circ} = 84$) que mostraron signos de estro durante 3 d. Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea continua dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (\pm sem) a lo largo de los tres tiempos de cuantificación. a,b indica diferencias entre los días del estro para $P < 0'01$ 56

Figura 27. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva recogidas en cerdas ($n^{\circ} = 16$) antes (15 min), durante y después (15 min) de cada una de las inseminaciones realizadas con el procedimiento denominado convencional o intra-cervical (IIC). Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea continua dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (\pm sem) antes, durante y después de cada una de las inseminaciones. 57

Figura 28. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva recogidas en cerdas ($n^{\circ} = 16$) antes (15 min), durante y después (15 min) de cada una de las inseminaciones realizadas con el procedimiento denominado post-cervical o intra-uterina (IIU). Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea continua dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (\pm sem) antes, durante y después de cada una de las inseminaciones. 58

Figura 29. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva recogidas en cerdas ($n^{\circ} = 17$) antes (15 min), durante y después (15 min) de cada una de las inseminaciones realizadas con el procedimiento denominado intrauterina profunda (DUI). Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea continua . 58 dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (\pm sem) antes, durante y después de cada una de las inseminaciones. 59

Figura 30. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva recogidas en cerdas ($n^{\circ} = 18$) sometidas a inseminación artificial a través de laparoscopia. Las muestras de saliva fueron recogidas momentos antes de la sedación (antes), durante la sujeción mediante lazo (sujeción) y a los 40 (Post-lap40), 80 (Post-lap80) y 120 min (Post-lap120) post-sedación, tiempos éstos que coincidían con el final de la laparoscopia, el despertar de la anestesia y la incorporación de la cerda, respectivamente. Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea continua dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (\pm sem) antes, durante y después de cada una de las inseminaciones. a,b indica diferencias entre los días del estro para $P < 0'01$ 60

Capítulo I: INTRODUCCIÓN

En los tiempos recientes somos testigos a nivel mundial de una creciente demanda de productos derivados de la carne de cerdo, como consecuencia del aumento de la población y una mejora en las aspiraciones nutritivas del ser humano. Esto ha determinado nuevos avances en las características de crecimiento y reproducción del cerdo para aumentar su competitividad y responder a las nuevas exigencias del mercado. La producción moderna porcina basa su éxito en la eficiencia. Este objetivo se puede conseguir con las optimizaciones de los recursos biológicos disponibles con la última intención de hacer la producción más rentable. Entre los recursos biológicos a optimizar estarían los eyaculados, particularmente aquellos procedentes de reproductores de alto valor genético.

Uno de los procedimientos más empleado en el manejo intensivo y que marca una de lo más grandes avances de la biotecnología de la reproducción es la inseminación artificial (IA), cuyo uso comercial ha sido clave para la mejora genética y el desarrollo industrial en el sector porcino. Desde el uso por primera vez por Ivanov en los años 1900 (Foote, 2002) esta técnica en los últimos tiempos ha conocido notables avances. Entre ellos, aquellos destinados a optimizar los eyaculados. Así se ha pasado de la inseminación intra-cervical o convencional (IIC), que requiere un elevado número de espermatozoides por dosis de IA, a procedimientos más eficientes como son la inseminación intra-uterina (IIU; Gil y cols, 2000) y la intrauterina profunda (DUI; Martínez y cols, 2001) o la inseminación por laparoscopia (LAP; Vazquez y cols, 2006). Estas nuevas y más eficientes técnicas de aplicación de las dosis seminales en el tracto genital de la cerda tienen como denominador común, son más invasivas que la técnica de inseminación convencional. Dicha circunstancia, motiva cierto recelo, considerando a dichas técnicas como invasivas y estresantes para las cerdas. Evaluar el nivel de estrés que la aplicación que dichas técnicas produce en la cerda será objetivo de este estudio.

Amplios sectores de la sociedad están, en estos tiempos, especialmente sensibilizados por el bienestar de los animales, particularmente por aquellos destinados al consumo humano y principalmente por los que están sometidos a un manejo intensivo. El bienestar animal es percibido cada vez más como un elemento integrante de la calidad de los alimentos que proceden de los animales. Las normas del bienestar del porcino en la Unión Europea están descritas en la directiva 2008/120/EC, (<http://eur-lex.europa.eu/>), la cual deben ser seguidas por las granjas de manejo intensivo y hacen especial énfasis en aspectos tales como la castración, amputación de la cola, el diseño de los parques, el espacio en m² por animal. Sin embargo, en ella no se recogen normas o recomendaciones relativas a los procedimientos de IA. Para evaluar el bienestar animal hay

distintos procedimientos, siendo la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA; Minton, 1994) un buen indicador de la perturbación del bienestar (Moberg, 1985).

Hoy es generalmente aceptado que el estrés puede perturbar la función reproductiva en varias especies (bovino: Herskin y cols., 2004; ovino: Daley y cols., 1999; Equino: Berghold, 2007; humana: Tarin y cols., 2010), incluyendo la porcina (Einarsson y cols., 2008). También se sabe que el efecto negativo del estrés en la función reproductiva depende de la duración del efecto estresante, del momento reproductivo en el que dicho estrés sucede, de la predisposición genética y del tipo del estrés (Madej y cols., 2005; Brandt y cols., 2006). Durante el estrés se activa el eje HHA (Minton, 1994), secretando glucocorticoides desde la glándula suprarrenal al torrente circulatorio. El principal glucocorticoide secretado en cerdos es el cortisol (Bottoms y cols., 1972). Por lo tanto el aumento de la concentración plasmática de cortisol se ha usado como un indicador del estado del estrés en los animales. En porcino se ha constatado su aumento en animales sometidos a diferentes situaciones estresantes (Turner y cols., 2002).

Normalmente el cortisol se mide en sangre, en suero o en plasma, y en menor medida en orina y heces. La detección de cortisol en dichos fluidos orgánicos acarrea sus problemas. La obtención de una muestra de sangre es un procedimiento que requiere la restricción del animal, lo que a su vez provoca estrés, al activarse el eje HPA (Nyberg et al, 1988). También implica otras limitaciones relacionadas con el uso del catéter venoso. La inserción del catéter es una técnica que requiere cierta especialización y es difícil que el catéter mantenga su funcionalidad por un periodo de tiempo largo, limitando su uso a un reducido número de animales y para un limitado tiempo. Además de los problemas relativos a la obtención de muestras, la medición de cortisol en sangre tiene sus limitaciones fisiológicas relacionadas con la saturación de la proteína que liga al cortisol (Brien., 1980). En cuanto a la orina, la recogida de muestras es difícil, requiriendo dispositivos especiales, lo que también limita su uso a un número reducido de animales. Además, los niveles de cortisol en orina dependen del volumen de orina (Cook y cols., 1997). Lo mismo se puede decir con relación al uso de heces para medir el nivel de cortisol. Como alternativa, se está usando cada vez más la saliva. Las limitaciones en la toma de muestras y la “validez biológica” se pueden superar en gran medida mediante la medición de cortisol en saliva. Este procedimiento de muestreo es relativamente fácil de realizar, no exige la retención del animal y se puede lograr en condiciones que son incompatibles con la toma de sangre y orina, por ejemplo durante el transporte. El cortisol pasa de inmediato de la sangre a la saliva en difusión pasiva, la concentración es independiente del flujo de filtración y es un reflejo del cortisol libre en sangre (Riad-Fahmy y cols., 1982; Cooper y cols., 1989; Cook y cols, 1996). Se ha demostrado en porcino que el nivel de cortisol en saliva es un buen indicador del cortisol

libre en plasma (Cooper y cols, 1989; Cook y cols, 1996). Por lo tanto, medir el nivel de cortisol en saliva es informativo del estrés que sufre un animal.

Referido a la duración del proceso de inseminación, el estrés que se puede crear es del tipo agudo. Evaluar el nivel de cortisol es un buen indicador del estrés agudo, y se ha demostrado que cuando se induce una situación de estrés los niveles de cortisol se incrementan inmediatamente desde el inicio del estrés, alcanzando niveles máximo dentro de los primeros 15 min (Farmer y cols, 1991). En cuanto a si el proceso de inseminación causa o no estrés en la cerda, es todavía tema de discusión. En el único estudio realizado hasta la fecha se demuestra que la inseminación, convencional o IIU, no genera más estrés que la monta natural (Norrby y cols., 2007), estrés que, además, podría estar más asociado al estímulo generado por la presencia del verraco, ya que las inseminaciones se realizaron en presencia del verraco, que al hecho en sí de la inseminación.

Los objetivos del presente estudio van orientados a aportar información de si las inseminaciones, independientemente del procedimiento empleado para ello, crean estrés en las cerdas, y llegado el momento que así sea si dicho estrés, siempre en términos de cortisol en saliva, es mayor que el ocasionado por otras situaciones fisiológicas como podrían ser el destete o el propio estro. También se pretende evaluar la posible relación entre los niveles de cortisol en saliva, valorados durante la inseminación, y la posterior fertilidad de las cerdas inseminadas. Al respecto, no existen todavía estudios sobre dicha relación. En un estudio donde se induce la producción de cortisol mediante la administración de ACTH por 48h durante el periodo preestral, se observó que dicha producción afectó negativamente el crecimiento folicular, la ovulación y que alargó la duración del estro (Einarson y cols, 2007).

Capítulo II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANTECEDENTES HISTORICOS Y ESTADO ACTUAL DE LA PRODUCCION PORCINA

El cerdo domesticado tiene su origen en el cerdo salvaje euroasiático (*sus scrofa*), y ha sido parte de la historia de la humanidad desde prácticamente los comienzos de la misma. Los registros arqueológicos indican que la domesticación empezó por primera vez en el suroeste de Asia unos 9000 años antes de hoy, difundiéndose desde aquí, unos 6000-7000 años antes de hoy, al sureste del Europa (Porter, 1993). Con la domesticación, el cerdo se sometió a la selección genética realizada por sus criadores y las razas fueron cambiando de acuerdo a los cruces que se hicieron eligiendo los caracteres elegidos por el hombre (Darwin, 1859). Con el paso de los siglos, los cerdos se hicieron parte de la vida cotidiana de la población, manejándose en un principio alrededor de las viviendas en grupos grandes hasta que llegaron las primeras instalaciones de manejo intensivo en la década de los 60 (Daelemans, 1984).

La intensidad en el manejo y la producción han crecido mucho, desde las primeras instalaciones intensivas hasta nuestros días. El cerdo sigue siendo el principal productor de carne mundial y en el año 2009 la producción de carne porcina fue 106.069×10^3 toneladas de carne, FAOSTAT, 2009. (<http://faostat.fao.org/>). Una parte importante de este resultado es producto de un manejo intensivo del cerdo. A pesar de la existencia de un gran número de fenotipos, el cerdo de hoy tiene el fondo genético muy parecido al de sus antecedentes, lo que significa que la adaptación de la vida libre a las instalaciones del manejo intensivo es un cambio muy drástico. En las condiciones del manejo intensivo actual los animales no pueden desarrollar determinados comportamientos y/o actitudes habituales en la vida en libertad. El manejo intensivo tiene como objetivo la máxima producción y no mantener las condiciones naturales y fisiológicas que el animal tenía en la vida libre. La aplicación de técnicas de manejo intensivo puede afectar al bienestar animal así como a los parámetros reproductivos debido a la presión del estrés que se ejerce sobre los animales (Blokhuis y cols., 1998).

2.2 PAPEL DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL EN LOS SISTEMAS ACTUALES DE PRODUCCION PORCINA

2.2.1. La Inseminación Artificial y su importancia en la especie porcina.

Una de las biotecnologías más antiguas usada en las granjas de porcino es la Inseminación Artificial (IA). Este método que se aplicó por primera vez por Ivanov en los años 1900 (Foote, 2002), es hoy en día una de las técnicas más usadas en las granjas a nivel comercial, esto es debido a una de sus ventajas principales que es la aceleración del mejoramiento genético. Esto se alcanza con la transferencia del potencial genético de los mejores machos a un gran número de hembras, aumentando el diferencial de selección (Roca y cols., 2006).

En la especie porcina la aplicación comercial de la IA empezó en el año 1980, siendo ahora una técnica rutinaria. A finales del año 1990, el 50 % de las cerdas a nivel mundial se inseminaron con IA, técnica que ha venido creciendo en todo el mundo. En algunos países europeos como: Italia, Noruega, Holanda, España y Bélgica casi en el 80% de las granjas se usa esta técnica (Weitze, 2000).

Hoy en día 25 millones de IA se registran en todo el mundo y 99% de estos se hace con inseminación artificial convencional (IIC), utilizando semen diluido en estado líquido, conservado a temperaturas de entre 15-20 °C durante alrededor de 3 días. La IIC consiste en la deposición del semen en la parte posterior del cérvix con un catéter que se fija en los pliegues del cérvix imitando la monta natural, (ver **Figura 1**), esta técnica se estableció por primera vez por Melrose y O'Hagen, se sigue usando en todo el mundo (Roca y cols., 2006). Este protocolo incluye una cantidad grande de espermatozoides por dosis (3×10^9 espermatozoides por dosis de inseminación) en un volumen de inseminación de unos 80-100 ml de semen diluido, (Johnson y cols., 2000). Esta técnica tiene resultados de 80-90% de fertilidad con un número de partos y tamaño de camada igual o más grande que la monta natural. El 1% que queda de las inseminaciones, se hace con el semen criopreservado en cuyo caso la dosis de inseminación es de $5-6 \times 10^9$ espermatozoides. A pesar del mayor número de espermatozoides criopreservados por dosis, la fertilidad es más baja que la que se obtiene con el semen fresco, esta realidad hace que el uso de semen descongelado tenga actualmente un uso reducido a nivel de granja. El uso generalizado de la IIC con el semen fresco es debido que es una técnica simple y fácil de aplicar, es barata, tiene una fertilidad alta y se ha usado en la reproducción porcina con éxito por muchos años.

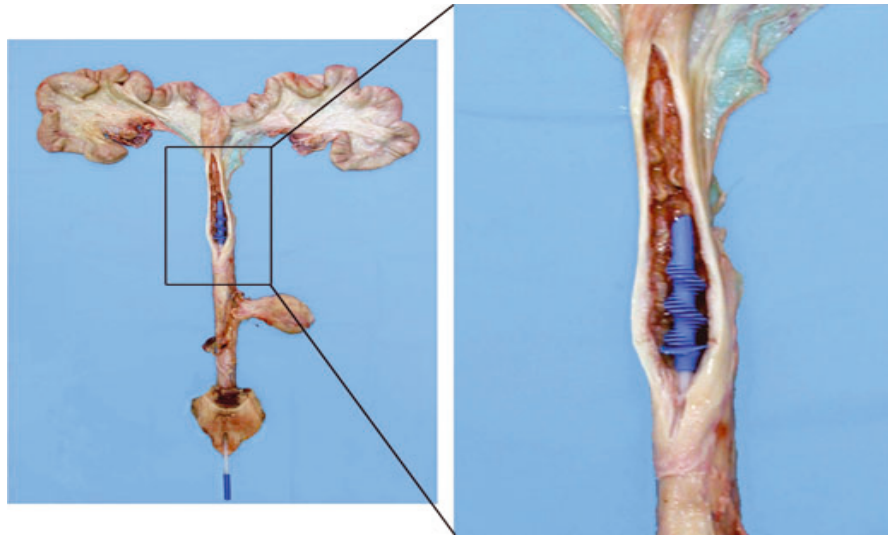


Figura 1. Inseminación Convencional (IIC), tomado de Roca y cols. (2006)

2.2.2. Nuevas técnicas de inseminación.

En los tiempos recientes y gracias a los numerosos avances realizados en el campo de la biotecnología de la reproducción porcina se encuentran disponibles nuevas técnicas de reproducción asistida que resultan de gran interés en ganado porcino. Estas técnicas como son: la criopreservación de espermatozoides, la separación de espermatozoides por citometría de flujo para preseleccionar el sexo de la descendencia, la creación de animales transgénicos mediante transferencia genética mediada por espermatozoides así como el uso de espermatozoides encapsulados y semen liofilizado requieren la utilización de procedimientos de inseminación que aseguren una alta fertilidad con un número bajo de espermatozoides por dosis.

Hoy en día se sabe que en la inseminación convencional el 90% de la dosis de semen se pierde en el camino hacia istmo del oviducto de la cerda. La primera barrera es el cérvix donde el 40% de semen se pierde por el reflujó del cérvix y la otra barrera es el ambiente uterino donde se genera una respuesta inmunitaria y se pierde 60% de dosis seminal. A pesar de los 3000 millones de espermatozoides que lleva la dosis, solo alrededor de $1-1.5 \times 10^3$

espermatozoides llegan al reservorio de semen en el istmo oviductal (Steverink y cols., 1998; Woelders y Matthijs., 2001; Eriksson y cols., 2002).

La necesidad de adaptarse a las nuevas biotecnologías reproductivas, con la intención de obtener una tasa de fertilidad y tamaño de camada grande usando un número bajo de espermatozoides por dosis ha determinado el desarrollo de nuevas técnicas de inseminación. Estas nuevas técnicas son tres: la inseminación post cervical (IIU), la inseminación intrauterina profunda (DUI) y la inseminación laparoscópica (LAP).

La IIU, se realiza con un conjunto catéter-sonda de 15-20 cm que sirve para depositar el semen en el cuerpo del útero (ver **Figura 2**). En este tipo de inseminación el objetivo es pasar el cérvix para evitar la pérdida de semen por el reflujo cervical. En esta inseminación se suelen usar 1.5×10^9 de espermatozoides por dosis de semen, es decir la mitad de semen que se usa en la inseminación convencional (Watson y Behan, 2002). En un estudio hecho por Roberts y Bilkei (2005) se registro una tasa de fertilidad de 87.8% con dosis de semen que llevaban una cantidad de 1×10^9 espermatozoides. Esta técnica tiene buenos resultados y se puede usar con el semen fresco y/o en combinación, en el futuro, con las nuevas técnicas de la reproducción asistida (Roca y cols., 2006).

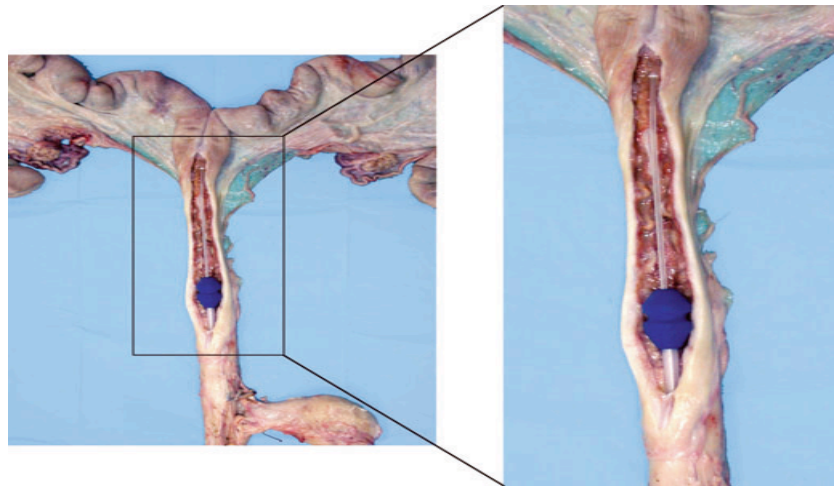


Figura 2. Inseminación Post Cervical, tomado de Roca y cols. (2006).

La DUI, se lleva a cabo con un conjunto de catéter y una sonda fina flexible que sirve para depositar el semen en el tercio distal del cuerno uterino (ver Figura 3). En la DUI se pasa la barrera cervical y una parte del útero dejando un número suficiente de espermatozoides en la

profundidad del cuerno uterino de tal forma que pueden pasar la unión útero-tubarica. En este tipo de inseminación son suficientes 6×10^8 espermatozoides por dosis de semen fresco y 1×10^9 espermatozoides por dosis de semen congelado (Vázquez y cols., 2006; Roca y cols., 2006; Martínez y cols., 2005) para la obtención de unos óptimos resultados. Esta técnica se puede usar con el semen criopreservado, semen sexado y semen modificado genéticamente (Roca y cols., 2006).

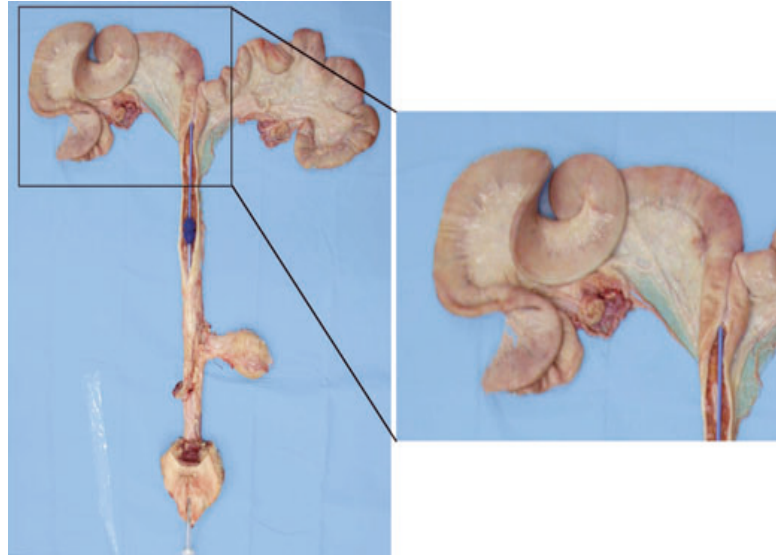


Figura 3. Inseminación intrauterina- Profunda, tomado de Roca y cols. (2006)

La inseminación laparoscópica, se hace con un procedimiento de cirugía mínimamente invasiva. Teniendo en cuenta las barreras fisiológicas en el transporte de los espermatozoides, en esta técnica se evitan la mayor parte de estas barreras ya que el semen se deposita directamente en el oviducto (ver figura 4) permitiendo así bajar mucho el número de espermatozoides que son necesarios para una inseminación exitosa. En este técnica el número necesario de espermatozoides por dosis se puede bajar hasta 0.3×10^6 espermatozoides de semen sexado para cada oviducto (Vázquez y cols., 2008). La aplicación de esta técnica, aunque todavía se encuentra en fase experimental, podría resultar rentable en combinación con semen sexado, semen congelado y con otros procedimientos en los cuales disponemos de número de espermatozoides reducido que además pueden tener limitada su funcionalidad (Roca y cols., 2006).

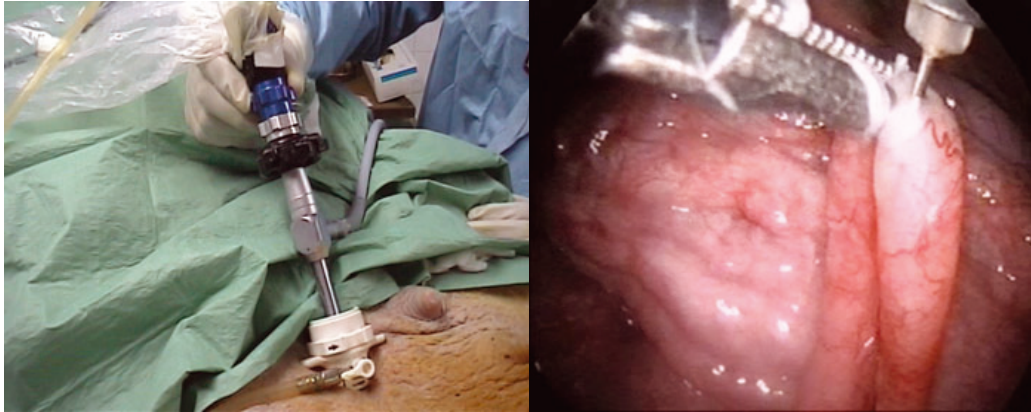


Figura 4. Inseminación por Laparoscopia, tomado de Roca y cols. (2006)

Todos estos nuevos procedimientos de inseminación son técnicas que requieren gente especializada y suponen un mayor invasión hacia al interior del tracto genital de la hembra (Roca y cols., 2006). Este hecho ha determinado el planteamiento, por parte de algunos autores, de dudas sobre el grado de trauma que se produce con estas técnicas a la mucosa uterina (Bathgate y cols., 2005). Esto lógicamente, está relacionado con cuestiones sobre el grado de estrés que se les produce a los animales con estas técnicas, siendo este tema importante sobre todo con la importancia que está ocupando el bienestar en la reproducción porcina.

2.3. BIENESTAR ANIMAL Y EL ESTRÉS

2.3.1. El bienestar animal

Como bienestar animal entendemos el animal en un estado físico, mental y de salud óptimo, en armonía con su ambiente (Hughes, 1976). Entre las muchas definiciones que existen sobre el bienestar animal, la definición más frecuente es del año 1996 hecha por Broom que define el bienestar animal como el estado del animal que está intentando hacer frente a su ambiente. En realidad el bienestar animal es un concepto mucho más amplio, siendo un término que expresa la preocupación de la sociedad sobre el cómo se encuentra un animal, un término que se introdujo por los críticos de la sociedad y los filósofos, en definitiva es un término complejo que tiene dimensiones científicas y éticas (Fraser, 1995).

Todas las definiciones que se han dado sobre el bienestar animal coinciden en tres grandes direcciones. La primera es la escuela de “la vida natural” que se refiere a las condiciones

de vida que le permiten al animal expresar su comportamiento natural y sus capacidades genéticas (Singer, 1975). La segunda es la escuela del “funcionamiento biológico” que se refiere al buen funcionamiento de los sistemas biológicos del animal como la base del bienestar (Taylor, 1972). La tercera es la escuela de los “sentimientos” que hace referencia a las emociones subjetivas y a la falta de emociones desagradables como el principal causante de un bienestar animal (Fraser, 2008).

¿Cómo podemos evaluar el bienestar animal?. En respuesta a esta pregunta el bienestar animal lo podemos evaluar en dos direcciones principales que son, los cambios del comportamiento y los cambios fisiológicos. Para hacer una evaluación previa del comportamiento es necesario saber el comportamiento normal que expresa un animal, estos cambios del comportamiento son importantes en la evaluación del bienestar animal, y reflejan una modificación de ese estado de bienestar en menos tiempo que los cambios fisiológicos. En los cambios del comportamiento se incluyen; el nivel de la actividad, la postura, escala del movimiento, escala del sueño y digestión, vocalización y la agresividad. Las alteraciones de estos comportamientos son típicos en el estrés crónico. (Broom, 1996; Keeling y Jensen, 2002; Squires, 2003).

Entre los cambios fisiológicos se incluyen la activación del eje HPA (Hipotalamo-Pituitaria-Adrenal) y la producción de su producto final el cortisol y la activación del sistema nervioso simpático. El aumento del latido cardiaco y otros efectos fisiológicos que se producen con la activación de estos dos sistemas son indicadores de un bienestar animal alterado (Moberg, 1985; Mormède, 1995).

2.3.2. ¿Qué es el estrés?

El estrés es un término difícil de definir con palabras sencillas, como consecuencia se le han dado distintas definiciones que tienen en común la definición del estrés como trastorno de la homeostasis. El fundador de este término en las ciencias biomedicinas, Hans Selye, definió el estrés como “una reacción inespecífica del organismo a cualquier demanda a la que se enfrenta” (Selye, 1974). Otra de las definiciones dadas para el estrés es: “una incapacidad de los animales para hacer frente a su ambiente” (Broom y Johnson, 1993). Más recientemente, Morberg hace referencia al estrés como una respuesta biológica generada cuando una animal percibe una amenaza de su homeostasis (Morberg, 2000). Von Borell da otra definición: “un amenaza que el cuerpo necesita ajustar, es una mezcla de componentes de naturaleza, fisiológica, física y

interoceptiva” (Borell, 2001). Actualmente con el estrés se hace referencia al estado fisiológico, de comportamiento y psicológico que se expresa en el animal cuando éste se enfrenta, a una situación potencialmente amenazante (Terlouw, 2005).

El término “estrés” se utiliza mucho hoy en día y forma parte del lenguaje de la vida cotidiana de tal manera que a primera vista parece que no haya necesidad de definición. Esta descrito que cuando un término de la ciencia base se usa abundantemente en la sociedad existe la posibilidad de su simplificación y alteración ocultando su origen y siendo un fuente de confusión (Selye, 1976). Así el termino estrés, actualmente, es un concepto científico que ha sido aceptado y ha pasado a ser demasiado conocido pero poco comprendido.

Hans Selye realizó un trabajo experimental sobre las hormonas femeninas. Parte de su experimento era la administración de varias sustancias a ratas de laboratorio. Evaluando sus experimentos, Selye vio tres cambios inesperados que consistían una triada de cambios morfológicos desconocidos, (ulcera gastro-intestinal, hipertrofia adrenal y atrofia timo-linfática), conocida como “la triada morfológica del estrés” y que fueron cambios inespecíficos en todas las ratas independientemente del tipo de sustancia y del tipo de manipulación sufrido por los animales. Este autor realizo comprobaciones en otras especies y los cambios eran igual de inespecíficos.

Para nombrar este fenómeno Selye relacionó estos hallazgos con el “síndrome del enfermo” estudiado en sus tiempos de estudiante de medicina. Este síndrome agrupa los síntomas generales que expresan pacientes que sufren distintas patologías y en base a este nombro la reacción inespecífica del organismo contra un agente indeseable encontrada en sus experiencias como el “Síndrome General de Adaptación” (SGD) dividiendo este reacción en tres fases: fase de alarma, fase de resistencia y la tercera y última fase que es la fase de agotamiento (Selye, 1936; Viner, 1999). Después de publicar este estudio en el año 1936, Selye siguió buscando un nombre para el agente que causaba este reacción inespecífica, después de muchos esfuerzos decidió aplicar el término “estrés” utilizado en las ciencias físicas e ingeniería (Szabo, 1985), haciendo que este término sea uno de los más citados en la literatura de biomedicina con más de 210.000 citas a partir del 1970 (Michel, 2007).

El estudio no empezó ni término con el uso de este término, el estudio del estrés data de mucho tiempo antes. Claude Bernard (1813-1878) fue el primero que definía el cuerpo como una matriz de fluido y explico en su tiempo los esfuerzos que hace el cuerpo para guardar la estabilidad de su ambiente interno frente a los desafíos del medioambiente (Gross, 2008). El segundo en la línea de Bernard, fue Cannon (1878-1945) el pionero de la palabra homeostasis

en biomedicina, y que explico el papel del sistema o del eje simpatoadrenal (SA) en la respuesta inmediata al estrés. La reacción inmediata del organismo contra las fuerzas que perturban su homeostasis, la liberación de catecolaminas en el corriente sanguíneo, preparando el organismo para la respuesta de “lucha y huida” dando importancia al sistema simpatoadrenal, a la medula adrenal y a las catecolaminas en la reacción inespecífica del organismo contra los desafíos que se le hacen a su homeostasis (Cannon, 1932; 1935) y el tercero fue Selye (1907-1982), anteriormente nombrado, que explico el papel de Sistema Hipotálamo-Hipófisoadrenal (HPA) y el “síndrome de adaptación general” que además del concepto de estrés introdujo otros nuevos términos como, glucocorticoides y mineralcorticoides (Szabo, 1985).

2.3.2.1. La respuesta fisiológica al estrés. Importancia del eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA).

Los factores estresantes pueden ser de naturaleza física, fisiológica o psicológica o una combinación de estos tres factores (von Borell, 2001). El Sistema Nervioso Central (SNC) evalúa todos los estímulos que percibe para detectar situaciones en las que una amenaza relevante está ocurriendo, si se identifica una amenaza el hipotálamo inicia una respuesta aguda (Moberg, 1985). La comprensión básica de la naturaleza del estrés no ha cambiado desde los días de Cannon y Selye, y actualmente se considera que tiene un carácter multifactorial y relativamente no específico con consecuencias fisiológicas y del comportamiento, que se producen principalmente por dos vías: neurovegetativa y neuroendocrina (Moberg, 1985).

En la respuesta neurovegetativa o simpatoadrenal, están involucrados el sistema nervioso simpático (SNS) y las glándulas adrenales. El sistema simpatoadrenal se activa en pocos segundos, preparando el animal para la respuesta “lucha y huida” e incluye una serie de eventos fisiológicos a corto plazo (Cannon, 1929). La respuesta SA llega a los tejidos diana a través del sistema nervioso. En el caso concreto de la medula adrenal las fimbrias preganglionares estimulan directamente la medula de las glándulas adrenales para liberar adrenalina y noradrenalina en la circulación periférica (Goldstein, 1987).

El aumento de adrenalina y noradrenalina resulta en la movilización de energía corporal almacenada para afrontar las exigencias de la situación de estrés a las que se enfrenta el organismo. Otros efectos que tienen estas sustancias son: el aumento del latido cardiaco, dilatación del árbol bronquial, dilatación de la pupila y la redistribución de sangre del sistema gastrointestinal y riñones hacia los músculos del esqueleto y el musculo cardiaco, órganos que más lo necesitan, (Undelsman y Goldbrook, 1994). Hay pocos estudios que hayan evaluado el

nivel de catecolaminas en sangre, debido a su alta variabilidad, a la dificultad de medir su concentración en plasma y porque el tiempo de liberación y eliminación es muy rápido (Minton, 1994; Sapolsky y cols, 2000).

Otra respuesta siempre presente ante un estímulo estresante es la activación del eje Hipotálamo-Pituitario Adrenal (eje HPA), con su producto final los glucocorticoides (cortisol), que se activa en situaciones de estrés como una herramienta para reponer los parámetros fisiológicos a un estado normal y para adaptar el organismo a la situación en la que se encuentra (Minton, 1994). Este eje HPA se activa en condiciones de estrés agudo junto con el sistema SA y si el estrés sigue por un tiempo largo, pasando de un estrés agudo a un estrés crónico, el eje HPA sigue siendo activo y dirige todos cambios que se provocan por este tipo de estrés.

El estrés crónico es la continuación del estrés agudo. La exposición al estrés agudo normalmente provoca la activación de eje HPA y el aumento del nivel de los glucocorticoides inmediatamente después, niveles que bajan a valores normales aproximadamente 15 minutos después, (Farmer y cols., 1991). Este fenómeno se llama respuesta adaptativa debido al rápido retorno a los niveles normales, pero si el estrés persiste más de algunos días entramos en un estrés de tipo crónico, al que pueden acompañar una serie de patologías como el desgaste muscular, la aparición de úlceras gástricas, la supresión del crecimiento, del sistema inmunitario y de las funciones reproductivas (Sapolsky, 1992). Además, en una situación de estrés, los glucocorticoides preparan el cuerpo para afrontar el estrés estimulando determinadas reacciones de comportamiento y la movilización de energía en forma de glucosa disponible, en este tiempo los eventos fisiológicos que no son imprescindibles para la supervivencia, como el crecimiento y la reproducción, se inhiben (Munck y cols., 1984).

Para tener un conocimiento más amplio de los mecanismos con los cuales el organismo reacciona en situaciones de estrés es importante conocer el funcionamiento del eje HPA mencionado anteriormente, como una de las dos vías principales que el sistema nervioso central usa para afrontar las situaciones de estrés.

El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) recibe numerosos estímulos de otros núcleos hipotalámicos (estos estímulos llevan señales metabólicas y de intervalos día-noche), desde el tronco del encéfalo (en relación con estímulos neuronales de la periferia), desde el órgano subfornical (que controla la composición del plasma sanguíneo) y del sistema límbico (que genera las señales relacionadas con el estado emocional). Esta multiplicidad de señales convergentes al PVN, explica la sensibilidad del eje HPA a una amplia gama de estímulos, tanto de origen interno como externo. En situaciones de estrés el núcleo paraventricular del

hipotálamo le da inicio la activación del eje HPA. Este eje consiste en tres elementos que son: el hipotálamo, la parte anterior de la hipófisis y la parte cortical de las glándulas adrenales y su principal función es el aporte eficiente de energía y mantenimiento de la presión hidrostática. (Dallman y cols., 1987; Manteuffel, 2002).

En situaciones de estrés el sistema límbico alerta al PVN que libera la Hormona Liberadora de Corticotropina (Corticotropin Releasing Factor; CRH) y Lisina-Vasopresina (LPV). La CRH y LPV estimulan la parte anterior de la hipófisis que libera la Hormona Adreno-Corticotropa o ACTH (Antony, 1993; Jenssen y cols., 1995b). En cerdos la CRH y la LPV tienen un efecto sinérgico, aunque la CRH tiene un mayor efecto estimulador para ACTH que la LPV (Minton, 1994). La CRH pasa del sistema portal sanguíneo a la parte anterior de la hipófisis donde estimula la secreción de ACTH, que una vez en el torrente sanguíneo tiene como principal órgano diana la zona reticulada de la glándula adrenal donde estimula la producción de los glucocorticoides (por ejemplo el cortisol). El cortisol puede inhibir o estimular el eje HPA dependiendo del lugar del sistema límbico donde actúe (ver **Figura. 5**).

El cortisol, como otra parte de las hormonas esteroideas, ejerce su efecto a través receptores intracelulares, más precisamente en el núcleo de la célula controlando la expresión de distintos genes y la síntesis de distintos productos peptídicos. Los glucocorticoides se unen con los receptores mineralocorticoides (RM) y glucocorticoides (RG), localizados en varios tejidos, incluso algunas aéreas del hipotálamo donde controlan el nivel de cortisol en circulación. En condiciones normales son los receptores de mineralocorticoides los que balancean el nivel de cortisol en circulación, y en condiciones de producción excesiva de cortisol, son los receptores de glucocorticoides los que se ocupan de la recuperación del nivel normal de cortisol (el efecto de retroalimentación negativa). La activación por un tiempo largo (un estrés crónico) de estos receptores puede producir una alteración del funcionamiento RG/RM que puede tener como consecuencia desordenes orgánicos durante una reacción de estrés (Van Praag y cols., 2004). Como se ha señalado anteriormente la exposición al cortisol por un tiempo largo tiene consecuencias negativas sobre el organismo como: atrofia muscular, insuficiencia en crecimiento, hipertensión arterial, inmunosupresión, etc (Munck y cols., 1984). Este hecho determina la importancia no solo de la activación sino también de la autorregulación del eje HPA y sobretodo de la retroalimentación negativa. El cortisol juegan un papel importante en la retroalimentación negativa sobre el eje HPA, ejerciendo el efecto de retroalimentación negativa a nivel de la parte anterior de la hipófisis, hipotálamo y las estructuras suprahipotalámica como hipocampos y amígdala cerebral para controlar la actividad del eje HPA.

La producción de las hormonas del eje HPA sigue, en condiciones normales, un ciclo circadiano, con niveles altos de cortisol y ACTH por la mañana y niveles bajos de los mismos por la tarde. Este es un ciclo que se establece durante la semana 20 de edad en cerdos en condiciones normales, sin embargo durante condiciones de estrés y dependiendo de las características del estrés este ritmo se altera. Debido a la organización del eje HPA la liberación de cortisol es un proceso gradual y el tiempo de reacción depende de la severidad del agente estresante. En situaciones de estrés agudo el eje HPA dependiendo de las características del estrés reacciona con velocidad. En cerdos se ha visto que durante el estrés agudo provocado con el freno nasal el nivel de cortisol es detectable dentro de los 15 minutos siguientes al inicio del estímulo (Parrot y Lloyd, 1995). Lo mismo se ve durante otros procedimientos dolorosos como son, la castración, corte de los dientes y amputación de la cola en lechones (Prunier y cols., 2005). Parecida es la reacción durante el estrés agudo en vacas donde durante las pruebas de aislamiento y fijación, el nivel de cortisol llega un máximo (Herskin y cols., 2004).

Durante las situaciones de estrés crónico el eje HPA no es permanente activado por el efecto de la retroalimentación negativa que ejerce el cortisol durante este tiempo. Esto se determina en general por la fuerza y las características de agente estresante. (Jensen y cols., 1996a). De eso se ha visto que durante un estrés crónico este ritmo se perturba. En un estudio se vio que cuando las cerdas se trasladaron de los parques y fueron estabuladas en jaulas durante 20 semanas el ritmo circadiano cambió su patrón normal. El nivel de cortisol se vio que era alto no solo por la mañana sino que también se notaba un aumento por la tarde y el patrón de cortisol tuvo una aparición planada (Janssens y cols., 1995a). En otras situaciones de estrés crónico se ha visto que el eje reacciona en otro modo. Así en un experimento donde a las cerdas se las sometió a un tratamiento de estrés crónico se vio que en el grupo donde las cerdas sufrían un estrés en la hora de inyectar ACTH las cerdas tenían un nivel más alto de cortisol comparado con el grupo de control (Janssens y cols., 1994).

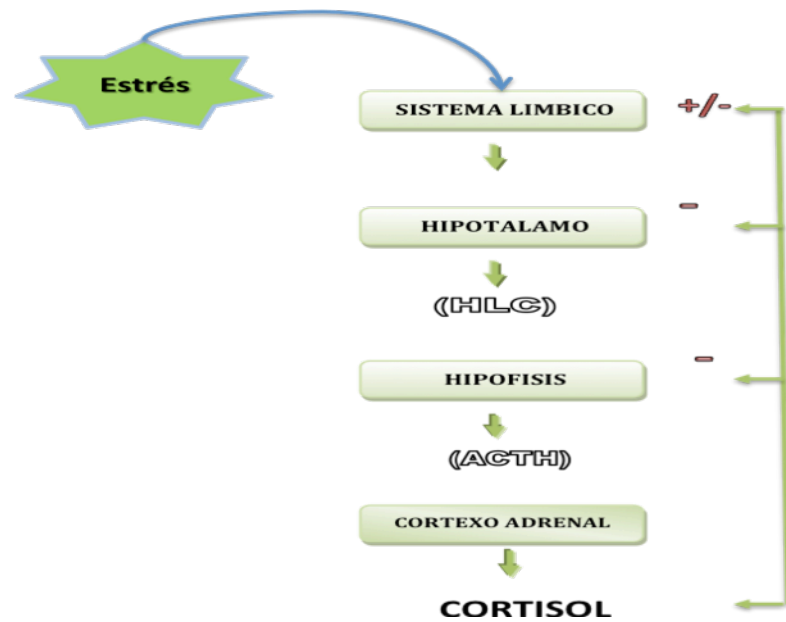


Figura 5. El funcionamiento del eje HPA, adaptado de Kranendonk (2006)

2.3.3. Bienestar animal y estrés.

El estrés y el bienestar animal comparten muchas cosas, los dos conceptos se han descrito en términos de la respuesta fisiológica y de comportamiento y las dos respuestas tienen muchas cosas semejantes. Las dos situaciones, el estrés y el bienestar animal son opuestas y se expresa uno u otro dependiendo del estado mental del animal y de cómo este percibe y evalúa las situaciones (Veissier y Boissy, 2006).

La sociedad actual es cada vez más sensible y está más preocupada por el bienestar animal. En el caso concreto de la especie porcina las preocupaciones están relacionadas con las condiciones de manejo de los animales, si son restringidas y difíciles, si sufren dolor durante la castración o amputación de la cola o durante otros procedimientos utilizados en las explotaciones. En el proyecto planteado por Velarde y Dalmau. (2010), se plantea un esquema de evaluación del bienestar de los animales en distintas instalaciones donde se encuentran. A partir de allí, la información pasa al consumidor, donde se informa sobre los estándares del bienestar animal que tiene cada instalación, donde proceden los productos que el compra (Figura 6).

Ante estas preocupaciones la Comisión Europea ha incluido en la legislación de bienestar animal unas normas mínimas de bienestar en la producción porcina. Estas normas están descritas en la directiva 2008/120/EC. (<http://eur-lex.europa.eu/>), que describe la legislación existente en el bienestar del porcino. En esta directiva están incluidos aspectos relacionados con el espacio libre que deben tener los animales, con los materiales utilizados en las instalaciones, con el manejo de los animales, con el acceso a la comida y al agua de los animales, con el tipo de alimento que deben recibir los animales según el periodo en el que se encuentren, con los estímulos ruidosos o lumínicos que sufren los animales y con las manipulaciones sufridas por los mismos ya sea con fines terapéuticos y/o diagnósticos.

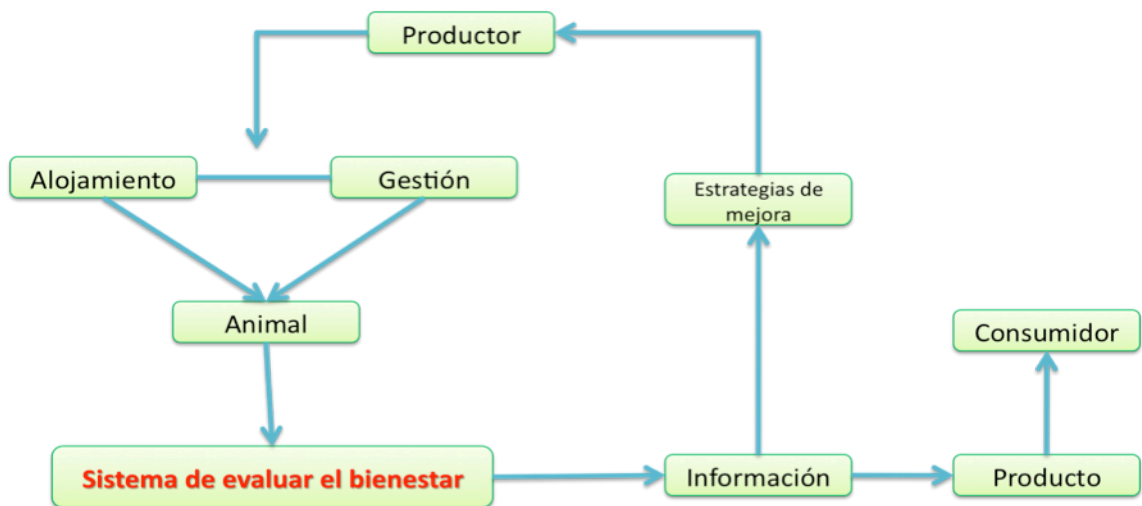


Figura 6. Esquema del sistema de la evaluación del bienestar animal, adaptado de (Velarde y Dalmau, 2010).

También se debe prestar atención a los aspectos relacionados con los operarios que están empleados en una granja. El papel del operario trabaja con los animales es fundamental para el bienestar animal y para la productividad de la explotación, aunque esto de forma general ha recibido poca atención en las instalaciones ganaderas. El siguiente estudio demostró que el papel y el impacto que el operario tiene en los animales no tienen que ser subestimado. De esto se desprende que los operarios que trabajan en las instalaciones de los animales tienen que tener la experiencia, el conocimiento y la conciencia adecuada para cada procedimiento que está relacionado con el animal en sí, con instalaciones y/o con el manejo. Se ha demostrado que un mal manejo tiene consecuencias negativas serias en el bienestar de los animales y en la productividad de las granjas. Sería deseable, por tanto, que en el futuro tanto

los ganaderos como la sociedad en general le dieran más importancia a este tema, asegurando la competencia de los operarios que trabajan con animales (Coleman y cols., 2000).

2.4. EFECTO DEL ESTRÉS SOBRE LA REPRODUCCION

2.4.1. Eventos endocrinos sobre la reproducción

La reproducción en las hembras está controlada por una serie de hormonas que interactúan entre el cerebro, la parte anterior de la hipófisis y los ovarios. Este sistema se conoce como el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), concretamente en la especie porcina las neuronas secretoras de esta hormona están localizados en el área preóptica media (Kineman y cols., 1988). En este punto la GnRH se libera de modo pulsátil en el sistema portal de la hipófisis, estimulando la parte anterior de la misma para secretar la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). FSH y LH pasan a la circulación sistémica y llegan a su destino que son los ovarios, donde tienen como función la estimulación de las células germinales, provocar la ovulación y la producción de hormonas del ovario que son progesterona, estrógenos e incluso los esteroides sexuales y la inhibina (Kraeling y Barg, 1990).

El éxito de la reproducción de una cerda depende del funcionamiento del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario que tiene que estar sincronizado con los eventos fisiológicos y del comportamiento. Como eventos fisiológicos y de comportamiento se entiende el ciclo estral de la cerda, que en la especie porcina tiene una duración de alrededor de 21 días (Hughes, 1982). La mayor parte del ciclo está dominada por la fase lútea donde domina la producción de progesterona y de estrógenos que ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre hipotálamo - hipófisis. La otra etapa comprendida dentro del ciclo estral de la cerda es la fase folicular que se caracteriza por la predominancia de los estrógenos que ejercen al principio un efecto de retroalimentación negativa y al fin de la fase folicular se transforma en retroalimentación positiva. El nivel alto de estrógenos induce los signos del celo, que se continúan con la secreción del LH y FSH que inducen la ovulación (Zeleznic y Hillier, 1996).

El estro y la ovulación ocurren en un tiempo idóneo donde ocurre la monta de las hembras, por parte de los machos, y que es un tiempo óptimo para la fertilización. La interrupción de cualquier de estos eventos del ciclo estral o la interrupción del tiempo en el que ocurren afecta a la reproducción.

2.4.2. La ACTH exógena y la reproducción

La ACTH se ha usado en varios estudios en cerdos con la intención de estimular la actividad del eje HPA y aumentar el nivel de cortisol. Los efectos del tratamiento fueron parecidos a un tratamiento con glucocorticoides.

Las evidencias que hay en cerdos son que la ACTH, probablemente su efecto lo ejerce con la mediación de la glándula adrenal y cortisol, esto lo demuestran experimentos donde en los animales ovario o adreno-ectomizadas el flujo del LH se bloqueaba solo en presencia de las glándulas adrenales intactas (Fonda y cols., 1984). Esto lo demuestran también los estudios hechos invitro donde se ha visto que la capacidad de las células del hipófisis de producir LH estimulada con GnRH se reduce con la presencia de cortisol y no cuando se cultivaban con ACTH (Li, 1987). La ACTH se ha visto que influye en muchos parámetros reproductivos, atrasando o bloqueando la ovulación (Liptrap, 1973) y atrasando o bloqueando la ola preovulatoria del LH (Hennessy y Williamson, 1983). En el estudio hecho por Einarsson y cols. (2007) la inyección de ACTH durante 48 h si vio un alargamiento del ciclo estral con 2.5 horas.

Emack y sus colaboradores. (2008), estudiaron el efecto de ACTH inoculada en lechones que provenían de madres tratadas durante tres periodos de gestación (días, P₁ 21-50; P₂ 51-80; P₃ 81-110) después de inseminar con el Acetato de Hidrocortisona (HCA). Los lechones que provenían de de este grupo de cerdas tenían un peso al nacimiento menor y la concentración de cortisol en los lechones tratados con ACTH fue más bajo en los lechones que provenían del grupo P₁ y P₃, muestreando que el aumento periférico de cortisol afecta los parámetros de la camada y la fisiología de los lechones.

2.4.3. Estrés relacionado con la reproducción

La existencia de interacción entre el estro, la reproducción y el estrés hace años que se sabe. El efecto del estrés en la reproducción depende de cuando ocurre, si ocurre en un tiempo critico que sería relacionado con la fase del ciclo estral, de la predisposición genética al estrés y del tipo de estrés. El efecto del estrés depende también del tiempo que dura, sabiendose que el estrés crónico afecta la reproducción (Clarke, 1992; Tilbrook y cols., 2002; Turner y cols, 1999a) y por tanto a la productividad de las explotaciones (Hennessy y Williamson, 1983). Este efecto negativo del estrés sobre la reproducción ha sido descrito en diferentes especies (bovino:

Herskin y cols., 2004; ovino: Daley y cols., 1999; Equino: Berghold, 2007; humana: Tarin y cols., 2010), incluida la especie porcina (Einarsson y cols., 2008).

El estrés puede ser de tipo, físico, psicológico o fisiológico y puede ser de dos formas: agudo que dura segundos, minutos o pocas horas y crónico que dura días, semanas o meses. En la mayoría de estudios realizados en referencia al efecto del estrés sobre la reproducción se estudia el efecto del estrés crónico sobre los procesos reproductivos, y hay pocos estudios hechos sobre el efecto del estrés agudo sobre la reproducción. Sin embargo, una idea generalizada a este respecto es que la cerda es vulnerable a los efectos del estrés agudo durante una serie de eventos que acompañan al estro y la ovulación (Morberg, 1985b; Varley y Stedman, 1994).

2.4.4. Estrés crónico y reproducción.

Es evidente que el estrés durante un largo tiempo afecta a la reproducción, a pesar de esto siempre hay individuos que son resistentes al estrés largo o crónico. En condiciones productivas, hay distintas situaciones que someten a las cerdas a condiciones de estrés crónico como, la densidad de animales (área en m²/cerda), la interacción del personal de trabajo con los animales, el sistema de alojamiento (atadas, manejo en jaulas o corrales), y/o el ambiente social (Varley y Stedman, 1994).

En este sentido se realizó un experimento con cerdas que se alojaron en dos condiciones de densidad, alta densidad (1m²/cerda) y baja densidad (3m²/cerda), por 21 días. En este experimento las cerdas en condiciones de densidad alta tenían niveles más altos de cortisol comparado con las que estaban en condiciones de baja densidad. Estos niveles altos de cortisol se reflejaron en los parámetros reproductivos y el número de cerdas en estro y de cerdas inseminadas fue menor en el grupo de animales alojado en alta densidad. En este experimento se comprobó también que las cerdas que mostraron estro, así como las inseminadas dentro del grupo estabulado en alta densidad no se afectaron por la exposición a este estrés mostrando una resistencia individual a las condiciones de densidad (Hemsworth y cols., 1986b).

En otro estudio las cerdas se sometieron a dos tratamientos distintos, en el primer tratamiento se realizó un “manejo no satisfactorio” que implica el movimiento en bloque 3 veces a la semana en la semana 11 de edad, durante este periodo de tiempo otro grupo de cerdas fue expuesto a un tratamiento “bueno” que incluye caricias ligeras del personal técnico. En las medidas de cortisol que se hicieron en la semana 20, el nivel más alto de cortisol era en el grupo

del tratamiento no satisfactorio. Se noto la diferencia entre los dos grupos en los parámetros de reproducción, y un 33% de las cerdas del grupo “no satisfactorio” se diagnosticaron gestantes mientras que en el grupo de tratamiento “bueno” quedaron gestantes un 88% de los animales. Esto demuestra que un manejo inadecuado afecta a la reproducción, pero se nota que durante el experimento el comportamiento de las cerdas del grupo “no satisfactorio” durante la pubertad y el estro era semejante con el grupo del tratamiento “bueno”. Los datos mostraron además que 3 animales incluidos en el grupo del tratamiento “no satisfactorio” eran resistentes al nivel de estrés crónico (Hemsworth y cols., 1986a).

En el estudio hecho por Soede y su colaboradores. (1997), donde se hizo la comparación del nivel de cortisol en las cerdas alojadas en jaulas individuales o en parque, observándose que el nivel de cortisol era más alto en cerdas alojadas en jaulas que en cerdas alojadas en parque, la tasa de gestación fue más baja (65,9%) en los animales alojados en jaulas individuales comparado con el obtenido en las cerdas alojadas en parque (85,7%). No hubo diferencia entre los grupos respecto al comportamiento durante el estro y al tamaño de camada. También relacionado con el tipo de alojamiento se ha visto que a pesar de que algunas cerdas eran resistentes y no se afectaron por ser alojadas en jaulas individuales, en el 66% de ellas se noto una duración del estro más bajo ($42 \pm 2h$) comparado con el otro grupo que era ($63 \pm 2h$) (Soede y cols., 1997).

Recientemente, Lay y colaboradores (2008) hicieron un experimento en cerdas preñadas para evaluar el efecto del estrés inducido por la inyección del ACTH y un tratamiento que suprime el estado de confort en animal, del día 42-77 de la preñez en el desarrollo de los lechones y la reacción al destete. En los resultados se vio que los lechones que provenían del grupo de las cerdas a las que se inyectó ACTH tenían niveles más altos de cortisol y una distancia ungió-genital más pequeña comparado con el grupo control y con el grupo del tratamiento que suprime el estado de confort en animal. El grupo con tratamiento “insatisfecho” tenían valores intermedios, los dos tratamientos usados en este experimento no tuvieron efecto sobre el crecimiento o el sistema inmunitario de los lechones.

En un estudio hecho con conejillos de india donde las madres le sometieron a un estrés crónico en la segunda parte de la gestación hasta el destete de los gazapos, para ver qué consecuencias hay en los lechones, durante el experimento se vio que las madres tenían valores altos de cortisol comparado con el grupo control. En los gazapos se vio que los machos eran más vulnerables a este tratamiento presentando un peso corporal bajo y dificultades locomotoras. En las hembras estos efectos no se notaron, pesar de esto en los machos así que en las hembras se noto un aumento del nivel basal cortisol en saliva (Emack y cols., 2008).

2.4.5. Estrés agudo y reproducción

Hasta el momento se han hechos pocos intentos para evaluar el impacto del estrés agudo en la reproducción del cerdo. No hay evidencias claras de como el estrés agudo puede afectar la reproducción en cerdas sobre todo cuando se produce en la fase folicular del ciclo estral (Moberg, 1987). La idea es que el estrés agudo durante la fase folicular, puede afectar a los eventos que vienen después como, el estro, la ovulación y posiblemente la fecundación y la gestación.

Esta hipótesis se basa en el nivel alto de estrógenos que hay durante este periodo, y que según un estudio hecho en ratones, podrían tener un efecto estimulador en el eje HPA. Este hecho no se ha comprobado en cerdas pero podría ser que ocurriera lo mismo que en ratones y que un estrés durante la fase folicular afectara los eventos reproductivos que ocurren durante este periodo (Da Silva, 1995).

Uno de los primeros estudios hechos sobre este tema nos muestra evidencias, aunque no bien argumentadas, de que en cerdas los síntomas de estro se atrasan cuando una cirugía o varias enfermedades ocurren durante la fase folicular. Estos resultados no son del todo determinantes ya que se desconoce si las cerdas eran fértiles o no, y también otros datos sobre parámetros como la ovulación y el nivel de LH (Hennessy y Williamson, 1983). En este sentido un estudio hecho por (Barb y cols., 1982) se vio que el tratamiento con ACTH y Acetato de Hidrocortisona, con la intención de aumentar el nivel de cortisol en circulación hicieron que la ovulación y la ola preovulatoria de LH se bloquearon. Por otro lado existen evidencias de que el estrés agudo tiene un efecto estimulador en algunos parámetros reproductivos (Turner y cols., 2002) y en esta línea también ha sido demostrado que el estrés durante el transporte avanzaba la pubertad en cerdas prepuberales (Hughes y cols., 1982).

En un estudio hecho por Turner y colaboradores (1999a) donde se estudio el efecto del aumento agudo y prolongado o sostenible del cortisol en la secreción de LH, estro y ovulación se vio que el aumento agudo de cortisol no influyo en ninguno de los parametros evaluados, mientras que el aumento sostenible de cortisol inhibio la secreción de LH, ovulación y la aparición del estro. En un estudio parecido (Turner y cols., 1999b) se estudio el efecto del aumento sostenible o agudo repetible de cortisol en la secreción de LH en cerdas ovariectomizadas y se vio que para bajar el nivel del LH es necesario un aumento sostenible de cortisol mas de 4 días y este efecto no se aumenta con la presencia de la retroalimentación negativa del estradiol. El mismo autor había demostrado previamente (Turner y cols., 1998) que

el aumento agudo repetible de cortisol no afectaba parámetros reproductivos como la ovulación, la tasa de preñez y el número de embriones. Otro grupo de autores (Pearce y cols., 1998) estudiaron el efecto de un aumento agudo de cortisol y del aumento agudo de cortisol acompañado con la administración GnRH. Los resultados demostraron que el aumento agudo del cortisol no aumentaba el nivel de LH endógeno, en los casos donde el cortisol se acompañaba con GnRH se vio que el nivel del pico de LH bajaba sin afectar cuando se produjo ese pico.

También ha sido estudiado (Turner y cols., 1998a) el efecto de la introducción del verraco para detectar el estro o la detección del mismo por el técnico sin permitir contacto con el verraco. Cuando el estro se detecto con el verraco aumento el nivel de cortisol en las cerdas, mientras que cuando no hubo contacto no se produjo este aumento.. Lo interesante en este estudio fue que en las cerdas que estuvieron en presencia del verraco se noto un aumento de la ovulación y el ciclo estral fue más corto. En una publicación mas reciente (Turner y cols., 2005), se sugiere que los parámetros reproductivos de las cerdas no se afectan con el aumento cronico o con el aumento agudo sostenible de cortisol, comprobando la resistencia de las cerdas a estos tratamientos. Los autores sugieren que solo si el estrés o el nivel de cortisol es sostenible (<4 días) puede afectar los parámetros reproductivos.

2.4.6. El estrés durante el destete.

El destete ha sido descrito como un periodo estresante que se acompaña con el aumento del estrés y como consecuencia del nivel de cortisol. Esto se vio en un estudio hecho por Ash y Heap (1975), en este estudio se midio el nivel de progesterona, estrógeno y cortisol. Esto se hizo en el final de gestación, lactación y después del destete. Hubo un gran aumento en el nivel de cortisol durante parto, destete y estro. Un hecho interesante de este estudio es que en una de las cerdas 4 días después del destete (que se hizo el día 31) el nivel de cortisol estaba bajo produciéndose un pico del cortisol el quinto día tras el destete, tiempo que coincido con el estro. Un nivel alto de cortisol durante el parto y al inicio del estro se observo en el estudio hecho por Kunavongkrit y cols. (1984).

Otro estudio hecho por Wise y cols. (2001) donde se midieron las hormonas foliculares y el cortisol en dos razas de cerdas, Meishan e híbridos blancos, desde después del destete hasta la fase luteal del ciclo estral indicaron que el nivel de cortisol era más alto en las cerdas Meishan y alcanzaba un pico el primer día del destete y el séptimo día después del destetar, tiempo que coincide con el ciclo estral. El nivel alto de cortisol en el primer día del destete ha sido descrito

en otros estudios (Guedes y Nogueira., 2001; Hulthein y cols., 2002) en los que se midió el nivel de cortisol durante la lactación, y después de destetar. Hay que destacar que en el estudio hecho por Guedes y Nogueira (2001), el nivel de cortisol fue más bajo los últimos 6 días de gestación y los 2 primeros días de lactación.

2.4.7. El estrés durante la monta natural y la inseminación artificial.

La cantidad de información que existe sobre el estrés que puede provocar la inseminación en la especie porcina es escasa sobre todo en lo relativo a las últimas técnicas de inseminación que están disponibles hoy en día. En los pocos estudios que hay vemos que el nivel de cortisol que se produce durante la inseminación no es relativamente grande y si nos fijamos en el estudio hecho por Norrby y colaboradores (2007) el nivel de cortisol durante la inseminación es más pequeño que cuando se usa la monta natural.

En este estudio (Norrby y cols., 2007) en el que se evaluó, entre otros parámetros, el nivel de cortisol en plasma durante la monta natural, inseminación convencional y la inseminación intrauterina se vio que el nivel de cortisol aumento de 75 nmol/l, 10 minutos antes de inseminar a 130 nmol/l después de inseminar, tanto en la inseminación convencional como en la intrauterina, a partir de este momento el cortisol siguió un nivel plano que duro 7-8 minutos para volver después al nivel inicial. En las cerdas inseminadas por monta natural el nivel de cortisol fue más alto llegando un pico 144 nmol/l, 15 minutos después de la monta. En las cerdas cubiertas de forma natural 10-20 minutos después de inseminar el cortisol seguía siendo más alto que en las que en las inseminadas independientemente del método de inseminación utilizado. En este estudio se observó también el aumento de los productos de la prostaglandina $F_{2\alpha}$, en las cerdas inseminadas en el modo convencional y por inseminación intrauterina, comparado con la monta natural donde no se vio este aumento.

El último estudio reciente hecho sobre la inseminación IIC es el realizado por Norrby y colaboradores en 2011, en el que la principal idea fue lo de evaluar el efecto de un fitoestrógeno que se encuentra en la soja, en el patrón de hormonas (entre ellos el cortisol) durante la inseminación por IIC en cerdas. De los datos que estos autores han registrado en el grupo de control que estaba compuesto por 5 animales inseminadas por el mismo procedimiento se noto un aumento de los niveles de cortisol a la hora de terminar de inseminar. Los niveles de cortisol de 125 nmol/L antes de inseminar y de 198 nmol/L 6 min después de la inseminación.

2.4.8. El estrés durante la inseminación laparoscópica.

Hay pocos estudios hechos sobre el nivel de estrés que se produce durante la realización de la laparoscopia en cerdos y menos sobre el efecto de la inseminación por laparoscopia. La mayoría de los estudios se han hecho sobre la aplicación de laparoscopia en humanos. En humanos se ha comparado el grado de estrés y los cambios neuroendocrinos que ocurren en una intervención abierta y en una intervención de mínima invasión como la laparoscopia. En los estudios realizados se demuestra que no hay una diferencia notable en el nivel de estrés que se provoca en cada procedimiento. En los estudios hechos en la especie humana las ventajas atribuidas a la laparoscopia están relacionadas con el nivel mínimo de lesión que se genera y con un tiempo de recuperación más rápido.

Los datos sobre el nivel de cortisol y estrés de estos estudios son contradictorios, en una parte de los estudios indican que el nivel de estrés es igual durante la laparoscopia y una intervención abierta (Joris y cols., 1992; Nguyen y cols., 2002), mientras que en otros se describe un nivel de estrés más bajo durante laparoscopia que durante las intervenciones abiertas (Miyake y cols., 2002; Buunen y cols., 2004). Esta discrepancia en los resultados se explica porque que la diferencia no se nota cuando la laparoscopia dura un tiempo largo (Ayres y cols., 2007) y por el efecto que distintos anestésicos tienen sobre la secreción de cortisol (Desborough, 2000).

Uno de los pocos estudios existentes sobre el efecto de la laparoscopia en cerdos, es el realizado por Burpee y colaboradores (2002) en el que se hizo una biopsia hepática en cerdas y se comparó entre la biopsia hecha a través de la laparoscopia o la biopsia hecha con cirugía abierta. Para hacer la comparación entre las dos técnicas se evaluaron el nivel de cortisol, interleucina-6, el factor necrótico tumoral, proteína reactiva C, grados de adhesión y otros parámetros de la respuesta inmunitaria. Al fin del experimento se notó que la diferencia en el nivel de cortisol entre los dos grupos era insignificante aunque el grupo de la laparoscopia tenía niveles más bajos de cortisol.

2.5. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS

2.5.1. El cortisol

La hormona liberadora de la corticotropina (CRH) liberada por hipotálamo actúa en el lado anterior de la hipófisis y causa la liberación de la ACTH, que es transportada por la sangre a la corteza suprarrenal donde induce la liberación del cortisol. La vasopresina y oxitocina

en sinergia con la CRH influyen en la liberación de ACTH (McCann y cols., 2000). El cortisol es un glucocorticoide con 21 átomos de C que pertenece a la familia de los esteroides junto con los andrógenos (C19), estrógenos (C18) y progesterona (C21) y a su vez todos proceden de colesterol, (**Figura. 7,8**). El cortisol pasa a la sangre y se puede detectar en heces, saliva, orina y leche (Kirschbaum y Hellhammer, 1989; Cook y cols., 1996). La medición de cortisol (corticosterona, en algunas especies) es un método tradicional para evaluar el estrés, a pesar de que la interpretación de los resultados puede ser difícil debido a la amplia definición del estrés (Einarsson y cols., 2008).

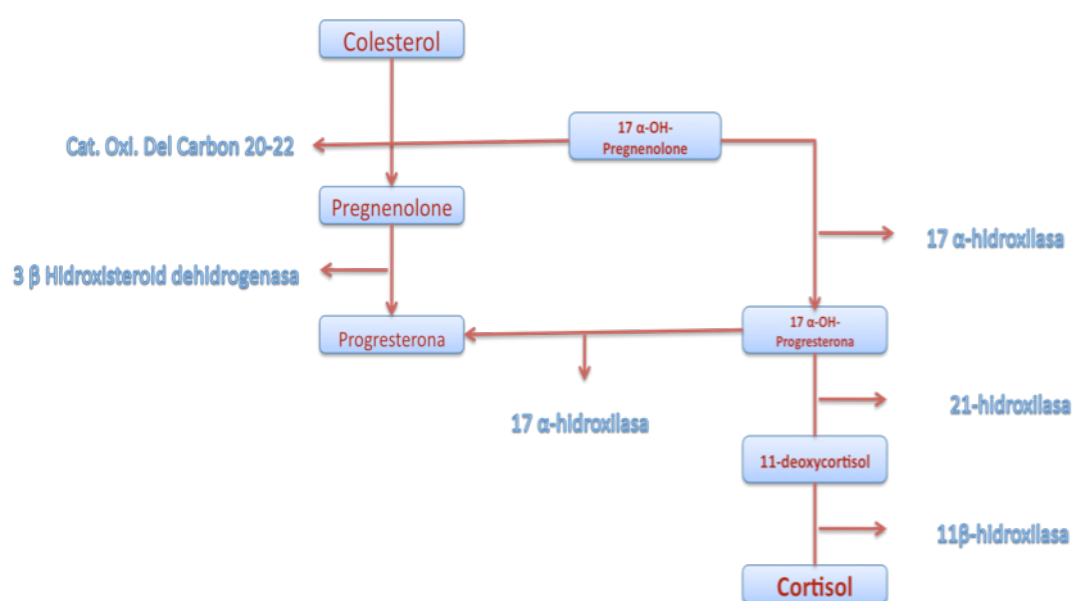


Figura 7. La producción del cortisol, adaptado de Martin. (1985).

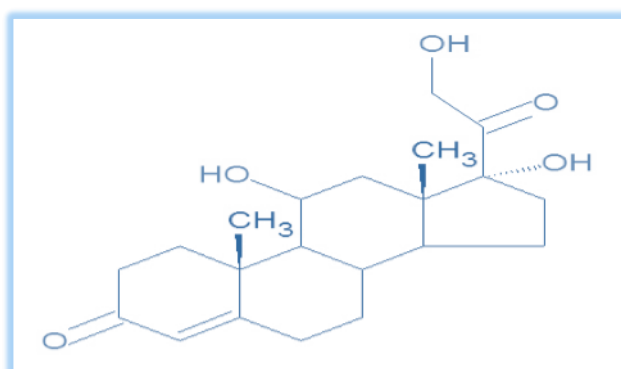


Figura 8. La estructura del cortisol ($C_{21}H_{30}O_5$) obtenido de Citizendium. Enciclopedia en línea. (David E. Volk).



Figura 9. Cortisone/Cortisol transformación, adaptado por Martin. (1985).

La mayor parte del cortisol está ligado con la globulina fijadora de glucocorticoides, (GFG) que es biológicamente inactiva, solo entre un 3 y un 10% está libre (no ligado con GFG) y es biológicamente activo pudiendo llegar a las células diana (Torpy y Chrousos, 1996). El cortisol es el principal glucocorticoide en ganado porcino y su concentración total (libre y ligado), sigue un ritmo circadiano. Este ritmo circadiano de cortisol en cerdos depende de la edad, sexo y las características del estrés. El ritmo circadiano empieza con niveles altos las primeras semanas de vida y se estabiliza en la semana 20, se ha visto, además, que los machos tiene niveles más altos que las hembras (Ruis y cols., 1997).

El estrés agudo se refleja en el nivel máximo de cortisol después de 15 minutos de iniciado el estrés, (Parrot y Lloyd, 1995). El impacto de la concentración de cortisol depende de tres factores que son: la concentración de GFG, la actividad de la enzima 11 β -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2 en las células diana que transforma el cortisol de forma activa a la forma inactiva (cortisona), (**Figura. 9**), y la presencia y la afinidad de los receptores para juntarse con el cortisol (Van Praag y cols., 2004).

Los glucocorticoides tienen muchas y variables funciones que tienen como intención el incremento de la energía como respuesta al estrés a través del aumento de la glucogénesis en el hígado, de inhibir el funcionamiento de la insulina y de aumentar la lipólisis (Munck y cols., 1984; Undelsman y Holbrook, 1984). El cortisol, de hecho, forma parte del grupo de los glucocorticoides y tiene los mismos efectos en el sentido de guardar la homeostasis. Así, el cortisol tiene efectos anabólicos en el hígado donde aumenta la producción a través la activación

del sistemas enzimático de glucogénico. Los efectos catabólicos donde aumenta la concentración de glucosa estimulando la glucogénesis el cortisol los tiene en otros tejidos como el musculo y el tejido adiposo. En el musculo el cortisol estimula la reducción de la síntesis de las proteínas aumentando la descomposición de las proteínas y acido nucleico, y en el tejido adiposo el cortisol estimula la lipolisis , incrementando la concentración del lactato (Fauci, 1979). Además el cortisol también tiene un gran efecto antiinflamatorio, teniendo efecto prejudicial sobre la inmunidad celular y humoral (Fauci, 1979; Elenkov y Chrousos, 2002). El cortisol tiene otros efectos también como: guardar presión sanguíneo, guardar la homeostasis de otros sistemas, del sistema cardiovascular, inmunitario, nervioso, endocrino los riñones y el musculo del esqueleto (Goulding y Flower, 2001)

Como se ha señalado anteriormente, las situaciones de estrés activan el eje HPA obteniendose como producto final el cortisol que se encuentra en plasma. El cortisol plasmático ha sido utilizado durante mucho tiempo como un punto de referencia en la evaluación del estrés y ha quedado demostrado que es un buen indicador del mismo. Esta asociación entre el cortisol plasmático y el estrés se ha usado en varios estudios destinados a evaluar si diferentes situaciones supuestamente estresantes, como la mezcla de animales de distintos orígenes, el traslado, la cirugía, y/o la administración de cortisol exógeno o la administración de ACTH se acompaña con el aumento del nivel de cortisol, (Dalin y cols., 1993; Janssens y cols., 1994). En este sentido hay otros muchos estudios en los que el cortisol plasmático ha sido identificado como un buen indicador del estrés (Terlouw y cols., 1997).

Estudios de niveles de cortisol han sido realizados en diferentes líquidos corporales como orina (Hay y cols., 2000), saliva (Cooper y cols., 1989), heces (Carlsson y cols., 2007) y en las ciencias forenses han llegado a usar el pelo como muestra para detectar el cortisol. El nivel de cortisol en sangre ha sido utilizado en muchos estudios, aunque hay experiencias donde es difícil tomar muestras de sangre como durante el transporte de los animales (Cook y cols., 1996). Además la toma de muestras de sangre supone una situación estresante por sí misma y tiene otras dificultades técnicas que se expondrán más adelante.

2.5.2. Métodos para evaluación del cortisol.

2.5.2.1. Determinación del cortisol en sangre.

La toma muestras de sangre y la evaluación de cortisol pesar de ser técnicas muy usadas tiene sus limitaciones que son relacionado con:

a) La extracción de muestras de sangre requiere la fijación y restricción del animal que son métodos que son en sí mismo estresante, (Fell y cols., 1985; Nyberg y cols., 1988). En estas condiciones siendo la evaluación de cortisol en sangre un método que no necesariamente refleja la situación real que está pasando el animal debido al estrés que pasa el animal durante la toma de sangre, existe una confusión en el grado de la activación del eje HPA y los niveles de cortisol determinados (Nyberg y cols., 1988). En estas circunstancias la medición del cortisol mediante un método menos estresante tiene más ventajas y nos da valores más fiables de aquello que queremos evaluar.

b) La toma de muestras de sangre requiere un personal cualificado en poner el catéter intra-venoso y en la especie porcina este procedimiento es todavía más difícil por la profundidad en que se encuentran las venas (excepto las orejas). La sangre tiene otras limitaciones relacionadas con la dificultad de tomar muestras de sangre fuera del recinto de los animales, el número limitado de animales que se pueden usar, y el tiempo limitado de tomar muestras.

c) En sangre encontramos un nivel total de cortisol formado por la fracción libre y por la parte ligada con la GFG. Sabiendo que en condiciones de estrés la GFG se satura esto haría que la fracción libre se aumentara en desproporción con el cortisol ligado, y por tanto la medición del cortisol total no necesariamente reflejaría la fracción libre biológicamente activa. Este hecho junto con la dificultad de las técnicas utilizadas para medir la fracción libre del cortisol en sangre hacen que este sea un método difícil de aplicar en condiciones rutinarias (Brein, 1980).

En estas circunstancias se busco un método menos estresante para el animal con el fin de tener valores de cortisol más fiables y más aceptables desde el punto de vista del bienestar animal, aspecto que está tomando hoy en día más importancia. En base a estos hechos se hicieron estudios alternativos en la especie porcina utilizando la saliva, orina y heces en lugar de sangre como muestras para determinar cortisol.

Uno de los métodos alternativos para evaluar el cortisol es su determinación en orina. El cortisol en orina representa la parte libre del cortisol en circulación, pero también la evaluación del cortisol en orina tiene sus limitaciones. Estas limitaciones están relacionadas con el número limitado de los animales que se pueden usar en el mismo tiempo y con el hecho de que el animal no orina en el tiempo que para nosotros sería válido. Además, la concentración de cortisol se expresa en unidades de cortisol sobre unidades de tiempo (que normalmente es 24 h). Por las dificultades técnicas pero también fisiológicas, la orina no se puede usar para evaluar reacciones de estrés agudo, porque como hemos visto en situaciones de estrés agudo el nivel de cortisol vuelve a bajar al poco tiempo y la producción fisiológica de orina no nos ofrece cantidades de orina en intervalos muy cortos (Cook y cols, 1997).

El cortisol se puede medir en heces, en realidad son los metabolitos de cortisol los que se detectan en heces. Este método tiene limitaciones semejantes a las descritas para la orina relacionadas con, una gran variabilidad de los resultados entre animales, las dificultades técnicas de coger las muestras y la imposibilidad de medir las situaciones de estrés agudo. En porcino tiene limitaciones específicas relacionadas con el tiempo largo del proceso fisiológico de formarse las heces, el intervalo entre la liberación de cortisol y el paso de sus metabolitos a heces. Además debe ser tenido en cuenta que estos metabolitos en cerdos componen solo 7% de la concentración de cortisol (Palme y cols., 1997; Mormede y cols., 2007).

2.5.2.2. La saliva como una alternativa viable para una evaluación objetiva de los niveles de cortisol.

El cortisol entra en saliva por difusión pasiva a través de las células acinares de las glándulas salivares, penetra solo la fracción libre en sangre que son moléculas pequeñas no ligadas con las GFG y la concentración en saliva es independiente del flujo de saliva (Walker y cols., 1978; Riad Fahmy y cols., 1982).

Los últimos estudios indican que la determinación de cortisol en saliva es una herramienta válida y eficiente de evaluar el cortisol por varias razones:

- a) Es un procedimiento no invasivo y menos estresante para el animal. Se puede usar con facilidad también en condiciones difíciles como durante el transporte. Además permite una evaluación del eje HPA a lo largo del tiempo, (por ejemplo para ver el ciclo circadiano) y también en situaciones de estrés agudo.

b) La saliva contiene la fracción de la parte libre del cortisol en sangre, que es la parte biológicamente activa del cortisol, en estas circunstancias, las muestras de saliva llevan una información cuyo nivel de significación biológica es más alta.

c) El cortisol se puede medir en pequeñas cantidades de saliva.

d) Es un procedimiento que no requiere un personal cualificado ni herramientas especiales.

e) Tiene un alto coeficiente de correlación positiva entre la concentración de cortisol en saliva y la fracción libre del cortisol en sangre.

La medición de cortisol en saliva pesar de sus ventajas tiene también sus inconvenientes como (Lwis, 2006) son:

a) En humanos la presencia de las enzimas 11 β -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2 y 17-hidroxisteroid deshidrogenasa, complica la relación entre los esteroides libres en saliva y en plasma.

b) Analizar esteroides en saliva puede ser un problema analítico ya que son niveles mucho más bajos que en sangre.

c) Un ensayo exitoso requiere kits especiales de medir cortisol en saliva o adaptar los ensayos en plasma para evaluar el cortisol en saliva.

d) Durante el muestreo de saliva existe una posibilidad de una contaminación por el uso de esteroides exógenos que se administran vía *oral*.

Debido las ventajas que presenta la evaluación del nivel de cortisol en saliva se está considerando y usando cada vez más en los estudios que implican la determinación de niveles de cortisol (Morberg, 1985). Además, se ha demostrado una alta correlación positiva entre el cortisol en saliva y la fracción libre de cortisol en plasma en la especie porcina (Parrot y cols., 1989; Cook y cols., 1996; Bushong y cols., 2000; Weston., 2009). Este correlación positiva se ha demostrado también en varias especies: ovina ($r = 0'88$; Yates y cols., 2010); bovina ($r = 0'71$; Negro y cols., 2004); caballos equina ($r = 0'80$; Peeters y cols., 2010); humana ($r = 0'62$; Restituto y cols., 2008); y canina perros ($r = 0'98$; Wenger y cols., 2010). Los primeros ensayos del cortisol en saliva se hicieron en humanos (Walker y cols., 1978).

La evaluación del cortisol en saliva, no está muy difundido en la especie porcina, a pesar de sus ventajas y de que en la mayoría de estudios se ha comprobado su utilidad para evaluar el estrés o evaluar el estado de eje HPA. Sin embargo algunos autores han expresado sus reservas acerca de este método (Parrott y cols., 1989; Blackshaw y Blackshaw, 1989).

Cook y colaboradores (1996) describieron la saliva como una alternativa óptima para evaluar el nivel de cortisol debido sobre todo a la alta correlación positiva que presentaba el nivel de cortisol hallado en saliva con la fracción libre del cortisol en sangre. Estos hallazgos los obtuvieron en un experimento realizado con 6 cerdos a los que les administraron ACTH para evaluar la reacción del eje HPA. La correlación entre el cortisol en saliva y sangre fue alta ($r = 0'88$), igual que en otro grupo de animales sometidos al estrés de restricción con lazo donde la correlación fue de $r = 0'79$. Durante la estimulación con ACTH se vio que el nivel de cortisol se aumento mas en plasma que en saliva, resultados parecidos durante la estimulación de estrés tuvo (Parrott y cols., 1989). En principio tenía que ser al contrario sabiendo el hecho de que cuando la GFG se satura, aumenta el porcentaje del cortisol libre, tal y como describen diferentes autores (Parrott y cols., 1989). Cook y sus colaboradores (1996) explicaron este hallazgo por una mayor capacidad y variabilidad que tiene la GFG en cerdos y no como se pensaba debido a una probabilidad del efecto dilución del moco que se mezcla con saliva. Otra cosa que se observó durante este estudio fue que el pico de cortisol fue más alto durante la estimulación con ACTH que durante la fijación con lazo. El autor les explica estos resultados por el posible nivel bajo de basal que tenían los animales que se fijaron con lazo y por un individuo que tuvo valores muy altos.

Los mismos resultados descritos por Cook y colaboradores fueron obtenidos por Bushong y colaboradores en 2000. En el trabajo de Bushong se hicieron dos experimentos, en el primero se evaluó el aumento agudo del cortisol estimulando su producción con inyección i.v e i.m de ACTH depo. En el segundo se evaluó el aumento crónico del cortisol, con la inyección i.m de ACTH y ACTH en gel. En estos experimentos se vio que el coeficiente de correlación entre el cortisol en saliva y plasma en la estimulación aguda con ACTH i.v. e i.m. fue respectivamente $r = 0'58$ y $r = 0'79$, mientras que en la estimulación crónica fue de $r = 0'30$ y $0'63$.

Sin embargo, hay otros estudios (Blackshaw y Blackshaw, 1989) en los que se describe una falta de correlación entre los niveles de cortisol en saliva y en plasma. Esta falta de correlación podría estar relacionada con las limitaciones metodológicas de la experiencia realizada por Blackshaw y Blackshaw. En su estudio estos autores desarrollaron distintos experimentos, en el primero tomaron muestras de las cerdas gestantes de 14 días. En el segundo se tomaron muestras de cerdas sometidas al efecto de la sujeción con lazo. En la tercera experiencia se tomaron muestras de cerdas sujetas en cuello con una cuerda y con el lazo. En el cuarto experimento se sometieron los animales a ejercicio físico y en el quinto y último se tomaron muestras de animales estimulados con pilocarpina. La falta de correlación entre el cortisol hallado en saliva y en plasma se podría explicar por la toma de una muestra

única de saliva después del estrés sin seguir la curva de cortisol. Además la saliva se colectaba con una pompa y el procedimiento duraba 5 minutos y la dificultad en sacar saliva, podría dar lugar a la obtención de valores que no fueran un reflejo real de lo que está pasando. Parrott y colaboradores (1989), hicieron un experimento parecido al de Cook y Bushong. En este caso los autores inyectaron ACTH en distintas dosis y vieron que no había diferencia entre las dosis de ACTH y el aumento del cortisol. De igual manera que Cook los autores obtuvieron una menor sensibilidad en la saliva para detectar un aumento en el nivel de cortisol comparado con el plasma.

La saliva se está usando más hoy en día para evaluar el nivel de cortisol debido las ventajas mencionadas anteriormente y por la alta correlación con la fracción libre de cortisol en sangre que ha tenido en varias especies. A pesar de esta falta de coincidencia en algunos estudios sobre la validez de saliva para evaluar niveles de cortisol, esta generalmente aceptado que es un método valido, como se comprueba en la mayoría de los estudios mencionados anteriormente. La falta de coincidencia en pocos estudios, podría estar más relacionado con las fallos metodológicos que con la eficiencia de saliva en si misma como muestra para evaluar el nivel de cortisol.

2.5.2.3. La varianza individual en la respuesta al estrés.

Independientemente del método utilizado para determinar el nivel de cortisol y por tanto el nivel de estrés debe ser tenido en cuenta que la respuesta del eje HPA tiene una gran variación entre individuos incluso si viene de grupos homogéneos (Ingram y cols., 1980). La respuesta al estrés está condicionada por distintos factores como el estado metabólico, la salud, la edad, la predisposición genética y la madurez sexual. Por otro lado la respuesta al estrés también depende de la naturaleza, la intensidad y la duración del estrés.

Se ha comprobado que el nivel de cortisol en cerdos baja entre la semanas 12 y 24 de edad y que en la semana 20 se alcanza la estabilidad en el ritmo circadiano de cortisol. También se han descrito niveles más altos de fracción libre de cortisol en machos que en hembras, lo cual puede ser debido una experiencia estresante anterior sufrida por los machos durante la castración que determina en una hipersensibilidad del eje HPA y un nivel más bajo de la globulina fijadora de cortisol que en hembras (Marco y cols., 1997)

La varianza individual entre los individuos en la respuesta al estrés complica la explicación de los datos y su validez en evaluar un estado fisiológico o un estado de estrés. La

variación refleja el papel del factor fisiológico, que está relacionado con los sentimientos, como determinantes de la respuesta al estrés. Scherer. (2001) explica que esta variación de los sentimientos son resultado de evaluaciones subjetivas de los estímulos, basándose en lo que es nuevo, el control y previsión que un individuo tiene (Wiepkema, 1990). En los últimos estudios al nivel genético se ha visto que la varianza en comportamiento y respuesta al estrés tiene una base genética (Murani y cols., 2010).

La variación individual en el comportamiento durante el estrés está relacionado con dos tipos de comportamiento para afrontar el estrés que el animal puede seguir y que se conocen como “la huida”, que es un comportamiento activo y “la adaptación” que es un comportamiento reactivo. Los cambios a nivel hormonal que hay entre las dos tipos de comportamiento es que “la huida” se caracteriza por liberación de las catecolaminas y “la adaptación” se caracteriza por la liberación los glucocorticoides (Henry y Stephens, 1977; Koolhaas y cols., 1999).

La variación individual mencionada en el párrafo anterior, tiene que ser tomada en cuenta a la hora de planificar y diseñar un estudio relacionado con niveles de cortisol en saliva. La variación entre individuos podría ser traducida en variación en distintos grupos de experimento, en distintas granjas de experimento y en distintos tipos de animales. Esta variación lógicamente, podría ser parte integral de grupo de animales que podrían ser incluidos en nuestro estudio. Sería razonable, por tanto, que este hecho relativamente importante a la hora de interpretar los resultados, fuera tenido en cuenta a la hora de diseñar un trabajo experimental. Esto se podría solucionar con un grupo control de animales. Este grupo control sería relativamente idéntico con nuestro grupo de experimento solo que no se sometería en la prueba experimental. Otra forma sería evaluar anteriormente los patrones de cortisol que tiene cada animal, antes de ser sometidos a la prueba experimental.

*Capítulo III: MATERIALES Y
MÉTODOS*

Los diseños experimentales y los protocolos de trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética para la experimentación con animales de la Universidad de Murcia.

3.1. Materiales

3.1.1. Animales, alojamiento y alimentación.

El trabajo experimental se realizó en dos granjas porcinas de la Región de Murcia, la granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia (Espinardo, Murcia) y la granja comercial Agropor S.L. (Las Torres de Cotillas, Murcia). Las cerdas empleadas fueron híbridas comerciales (Large White x Landrace), de 1 a 6 partos y con un peso que oscilaba entre los 150 y 250 Kg. Al destete, las cerdas se trasladaron a la nave de gestación y fueron alojadas en jaulas individuales (2.2 x 0.6 x 1,3 m/cerda) con suelo de rejilla bajo condiciones ambientales controladas mediante sistema “cooling” (temperatura media de 18 a 22 °C). La alimentación se realizó mediante la administración, dos veces al día, de un pienso comercial para cerdas en gestación (entre 1,8 y 2 Kg por animal/día; ver **Tabla 1**). El agua estaba disponible *ad libidum*.

Tabla 1. La composición del pienso para las cerdas.

| Componente | % |
|----------------|---------|
| Proteína Bruta | 13-16 |
| Grasas Bruto | 3-3.14 |
| Fibra Bruta | 6.6-7 |
| Ceniza Bruto | 5.3-5.5 |
| Lisina | 0.6-0.8 |

El semen empleado para las inseminaciones procedió de verracos de raza Duroc y de una línea híbrida comercial (Large White x Landrace). Todos ellos eran adultos (entre 2 y 4 años), de fertilidad probada y sometidos a recogidas regulares de semen (2 recogidas por semana). Los verracos se encontraban ubicados en 2 centros de inseminación artificial bajo similares condiciones de alojamiento y de alimentación. Todos ellos se encontraban alojados en parques individuales de unos 6 m² en naves con temperatura controlada (entre 15 y 25 °C) expuestas a la luz natural la cual se suplementaba con luz artificial hasta completar 16 h diarias. Los verracos tenían libre acceso al

agua y consumían una dieta comercial formulada de acuerdo a los requerimientos de verracos adultos (Chiba, 2006).

3.2. Métodos

3.2.1. Manejo reproductivo de las cerdas.

Las cerdas se destetaban cada jueves entre las 8 y las 10 h de la mañana tras una lactación media de 21 d (rango entre 18 y 24 d). Una vez destetadas, eran reubicadas en jaulas individuales en la nave donde se realiza la detección del estro y la consiguiente inseminación.

Todas las hembras utilizadas en este estudio fueron sometidas a un tratamiento de superovulación y sincronización de la ovulación consistente en la aplicación de 1.250 UI de gonadotropina corionica equina (ECG; FOLLIGON® 5000 Intervet, Boxmer. Holanda) administrada vía muscular a las 24 de del destete, y 750 UI de gonadotropina corionica humana (hCG; VeterinCorion: Divasa Farmavic, Barcelona. España) administrada también por vía muscular al momento de la detección del estro.

La detección del estro fue realizada por los técnicos de las granjas en las mismas naves de gestación, donde las cerdas estaban estabuladas, con ayuda de un verraco maduro que se pasaba por delante de las jaulas de las cerdas (**Figura 10**). La detección del estro se hizo dos veces al día, por la mañana y por la tarde. Se consideraba que una cerda estaba en estro cuando al paso del verraco mostraba el signo de inmovilidad frente al operario: Como signos complementarios también se valoraba el edema e hipertrofia vulvar y la posición en horizontal de las orejas. Una vez detectado el estro, se repetía el protocolo de detección cada 24 h para confirmar la existencia o ausencia del mismo.



Figura 10. Detección del estro mediante verraco en cerdas enjauladas.

3.2.2. Recogida y procesado de las muestras de saliva.

Para la toma de las muestras de saliva se utilizó varillas metálicas en cuyo extremo final se colocó una esponja comercial de uso común (Surplastic, Tobain[®] Huelva, España), con dimensiones de 2 x 1.5 x 1 cm, formando un hisopo, que se colocaba en la boca de cerda para que lo masticará durante un minuto aproximadamente hasta que la esponja tuviera una cantidad adecuada de saliva (**Figuras 11, 12, 13 y 14**).

Una vez que la esponja estaba bien empapada se introducía en los tubos específicos de saliva (Salivette[®], Sarstedt, Alemania) de los cuales se había eliminado previamente el algodón que tenían en su interior. La introducción de la esponja en los tubos se realizaba utilizando un embudo plástico y empujándola a través del mismo facilitando que la saliva en ella acumulada fuera depositándose en el interior del tubo. Una vez introducida la esponja, el tubo se cerraba y se colocaba en una gradilla en posición horizontal (**Figura 15, 16 y 17**). La utilización de esponja en lugar de algodón en los tubos se hizo en base a un trabajo reciente (Gutiérrez y cols., 2011) en el que se describe que la esponja es menos absorbente y ofrece una buena liberación de la saliva después de la centrifugación.

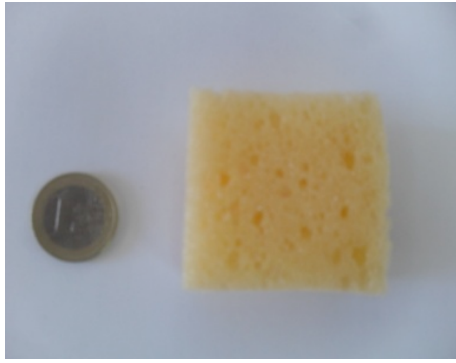


Figura 11. Esponja utilizada para hacer de hisopo.

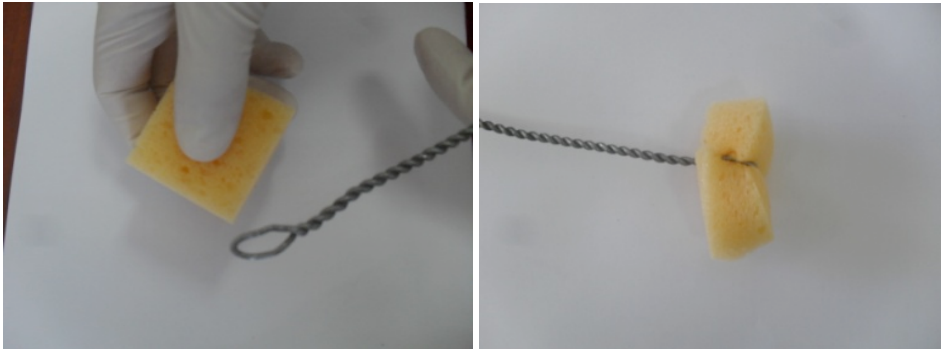


Figura 12. Colocación de la esponja en la varilla e hisopo preparado para su uso.



Figura 13. Hisopo introducido en la boca de la cerda.



Figura 14. Colocación de la esponja en el tubo.



Figura 15. Tubos de saliva preparados para centrifugar y esponja en el interior del tubo.

Una vez en el laboratorio, los tubos con las muestras de saliva se centrifugaron (Heraeus Sepatch Megafuge 1.0 R, DJB Labcare, Reino Unido) a 3000 x g durante 10 min (Gutiérrez y cols., 2011). Una vez centrifugadas, se aspiró el sobrenadante con micropipetas (Pipet-Lite LTS 100-100 μ l), teniendo mucho cuidado en no coger nada del pellet, y se depositó en tubos Ependorf de 1.5 ml. Los tubos, correctamente identificados, se almacenaron en un congelador a -80 °C hasta su momento de analizar los niveles de cortisol.

3.2.3. Recogida de los eyaculados y preparación de dosis de inseminación

La recogida de los eyaculados se realizó mediante el método de la mano enguantada y recogiendo solo la fracción rica del eyaculado. El eyaculado, inmediatamente después de la

recolección, se diluyó 1:1 (vol/vol) con BTS (Beltsville Thawing Solution; Pursel and Johnson, 1975; **Tabla 2**) previamente atemperado a 37°C. Una vez diluido el semen se enviaba al laboratorio donde se evaluaba la concentración, motilidad, formas anormales, siguiendo protocolos estándar (Roca y cols., 2006), y se preparaban las dosis de inseminación. Solo eyaculados con una concentración de más de 200×10^6 espermatozoides/ml, una motilidad superior al 75% y con menos de un 15% de formas anormales fueron utilizados para preparar las dosis de inseminación (Roca y cols., 2006). Para preparar las dosis de inseminación, el semen se diluía con BTS hasta 30×10^9 espermatozoides/ml. Las dosis, de 80 ml, se conservaban en el refrigeración a una temperatura de 17 °C hasta el momento de aplicación.

Tabla 2. Composición del diluyente Beltsville Thawing Solution (BTS)

| Componente | Mm |
|--|------------|
| Glucosa (G-6152, Sigma Aldrich) | 205 |
| Citrato sódico (S-4641, Sigma Aldrich) | 20'4 |
| Bicarbonato sódico (S-5761, Sigma Aldrich) | 15 |
| EDTA (E-6758, Sigma Aldrich) | 3'6 |
| Cloruro potásico (P-3911, Sigma Aldrich) | 10 |
| Kanamicina (K-4000, Sigma Aldrich) | 0'07 mg/ml |

3.2.3. Inseminación vía cervical.

Las inseminaciones por vía cervical se realizaron empleando los 3 procedimientos existentes en la actualidad, es decir la denominada inseminación cervical o intra-cervical (IIC), conocida como procedimiento tradicional o convencional de inseminación; la inseminación intra-uterina (IIU), también conocida como post-cervical, y la inseminación intra-uterina profunda (DUI).

Las IIC, se hicieron usando catéteres Safeblue ClearGlide® (Minitübe, Germany). El procedimiento de inseminación se realizaba como se describe a continuación. En primer lugar se procedía a limpiar cuidadosamente la vulva de la cerda con agua jabonosa y secarla posteriormente con papel desechable. A continuación se introducía el catéter de inseminación en el tracto genital de la hembra. Para ello se separaban los pliegues de la vulva y se introducía el catéter en la vagina en dirección dorso-craneal empujándolo suavemente hasta alcanzar el inicio del cuello del útero. Entonces se giraba el catéter, en sentido contrario a las agujas del reloj, facilitando que se enroscara en los pliegues del cuello del útero. Cuando el catéter quedaba insertado de forma correcta, lo que se verificaba intentando retirarlo sin conseguirlo, se procedía a depositar lentamente la dosis de inseminación, que para este tipo de inseminación presentaba un volumen de 80 ml con un número total de espermatozoides de 3×10^9 (Figura 16).

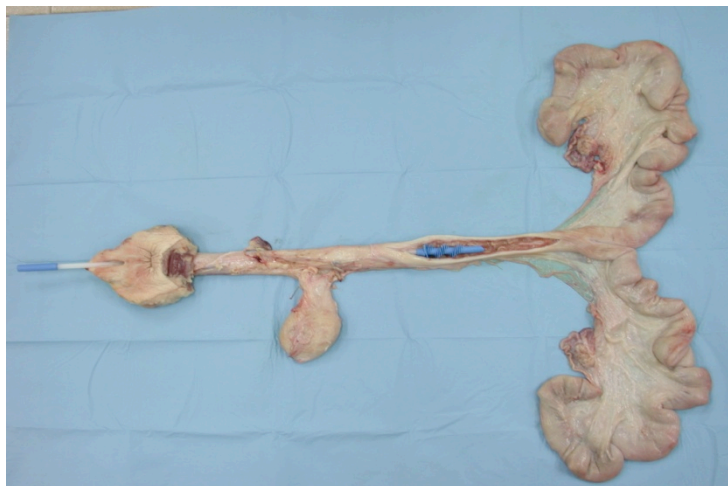


Figura 16. Inseminación intra-cervical. Posición del extremo del catéter entre los pliegues del cuello uterino

Para la realización de las IIU, se utilizaron catéteres Verona con Safeblue ClearGlide® (Minitübe, Germany), formando un procedimiento de inseminación que contempla un catéter de inseminación convencional por el que discurre una cánula de plástico de menor diámetro que permite atravesar el cuello del útero en su totalidad y depositar el semen en el cuerpo uterino (Figura 17).

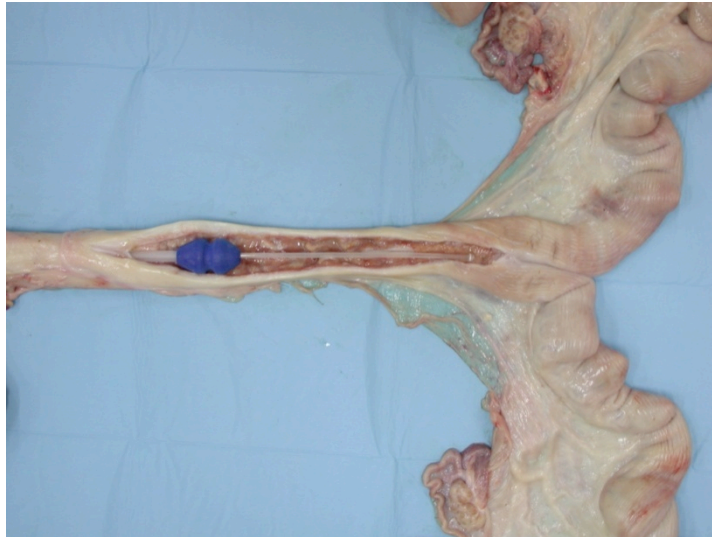


Figura 17. Inseminación intra-uterina. Disposición del extremo del catéter tradicional de inseminación entre los pliegues del cuello uterino y de la cánula interna que alcanza la luz del cuerpo del útero.

Para realizar la inseminación, una vez limpia el área perianal, se introducía el catéter convencional o tradicional de inseminación hasta insertarlo en los pliegues del cuello uterino. Una vez insertado en el cuello del útero y sujetado fuertemente, con la otra mano se empuja energicamente la cánula de 1 a 2 cm hasta abrir el tapón que sella el catéter. Una vez retirado el tapón, con movimientos suaves pero firmes se hace avanzar la cánula entre los restantes pliegues cervicales hasta alcanzar el cuerpo del útero. Una vez atravesado el último pliegue, se introduce la cánula un máximo de 3 cm para garantizar que la inseminación se realizaba en el cuerpo del útero.

En este tipo de inseminación se empleó un volumen de 40 ml de dosis de inseminación con una concentración total de $1'5 \times 10^9$ espermatozoides.

Las inseminaciones DUI se realizaron utilizando la sonda de inseminación intrauterina profunda Deepblue® (Minitübe, Germany), que tiene una longitud de 1'8 m, un diámetro externo de 4 mm e interno 1'8 mm. Para realizar la inseminación, una vez limpiada el área perianal, se inserta, en primer lugar, un catéter convencional de inseminación en los pliegues del cuello uterino. A continuación, se introduce la sonda intrauterina, empujándola de forma suave pero firme, sorteando los restantes pliegues del cuello uterino, alcanzando el cuerpo del útero y progresando a través de un cuerno uterino hasta alcanzar las profundidades del mismo o haber introducido toda la sonda (Martínez y cols., 2001, 2002). Una vez introducida la sonda se inyecta a través de la misma la dosis de inseminación que en este caso fue de 20 ml con una concentración espermática total de 6×10^8 espermatozoides, (**Figura 18**). Antes de retirar la sonda y el catéter, se inyectaron a través de

la sonda 2 ml del diluyente BTS para arrastrar hacia el interior del cuerno uterino los restos de la dosis seminal que pudieran haber quedado en el interior de la sonda.

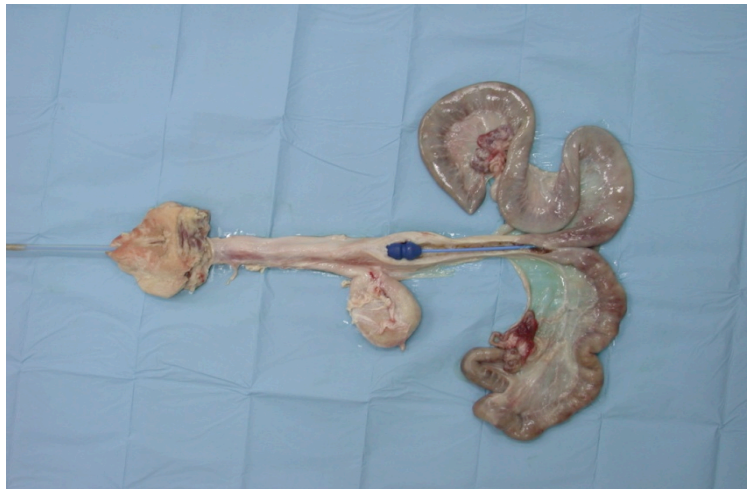


Figura 18. Inseminación intra-uterina profunda. Disposición del extremo del catéter tradicional de inseminación entre los pliegues del cuello uterino y de la sonda interna que alcanza la profundidad de uno de los cuernos uterinos.

3.2.4. Inseminación por laparoscopia.

La inseminación laparoscópica es una técnica quirúrgica mínimamente invasiva que permite depositar el semen directamente en el útero o en el oviducto y que resulta muy útil para cuando se requiere depositar un número muy reducido de espermatozoides.

Para llevar a cabo esta técnica los animales se sedaron mediante la administración de Azaperona (Stresnil[®], Boehringer Ingelheim, Alemania; 2 mg/kg de peso vivo, i.m.). Posteriormente, una vez inmovilizados con la ayuda de un freno nasal, se les indujo la anestesia general mediante la aplicación vía intravenosa de Tiopental Sódico (Tiobarbital[®], Braun Medical, SA, Barcelona, España) y fue mantenida vía inhalatoria con isoflurano (Isoba[®] vet, Madrid España, 100% p/p, Nr. regist. 1510). Las cerdas anestesiadas se colocaron en la posición de Trendelenburg en un ángulo de aproximadamente 20° respecto a la horizontal. Una vez que el animal a inseminar estuvo correctamente colocado, se procedió a la realización de una incisión de 1,5 cm cerca del ombligo y tirando de los bordes de la incisión se procedió a la introducción de un trocar de 12 mm de diámetro (Optiview trocar, Ethicon Endo-surgery Cincinnati OH, USA) por el que posteriormente se introdujo un laparoscopio de 0° dentro de la cavidad abdominal. Una vez en el interior de la cavidad abdominal, una parte del trocar Optiview es retirado y sustituido por el laparoscopio de 0° (Karl Storz, Tuttlingen, Alemania). En este momento, la cavidad abdominal se insufla mediante la

introducción de CO₂ hasta alcanzar una presión de 12 mmHg. Paralelamente, se colocaron dos puertos accesorios en el hemi-abdomen derecho e izquierdo, que sirven para la introducción de unas pinzas Duval de laparoscopia (Karl Storz, Tuttlingen, Alemania) cuya misión es la de manipular los cuernos uterinos y sujetar el oviducto para poder introducir dentro del mismo la aguja de inseminación que es manipulada por el segundo puerto accesorio (**Figura 19**). Tras la introducción de la dosis de inseminación (200 µl con un total de 1×10^6 espermatozoides por oviducto) en el oviducto (**Figura 20**), los trocares y puertos son retirados y las incisiones suturadas. El tiempo medio requerido para la realización de esta cirugía de mínima invasión es de sólo unos 15 min. Desde la sedación hasta el final de la intervención quirúrgica transcurren unos 40 min, despertándose la cerda unos 40 min después.



Figura 19. Inseminación por laparoscopia. Disposición del laparoscopio y de los puertos accesorios.

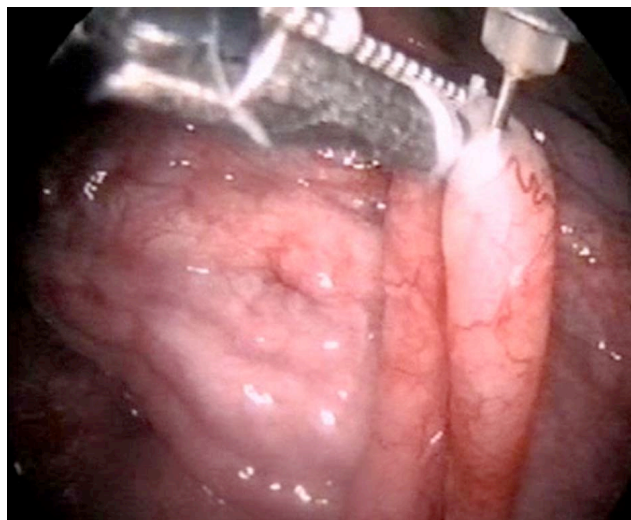


Figura 20. Inseminación por laparoscopia. Deposición de la dosis seminal en el interior de un oviducto.

3.2.5. Evaluación de la fertilidad.

La fertilidad fue evaluada de diferente manera según las inseminaciones fuesen vía cervical o por laparoscopia. En el primero de los casos, vía cervical, los embriones fueron recogidos vía quirúrgica después de una laparoscopia a los 6 días del inicio del estro. Para ello, las cerdas fueron sedadas y anestesiadas siguiendo el mismo protocolo que para las inseminaciones por laparoscopia. Una vez anestesiadas, el tracto reproductivo se exteriorizó mediante una incisión paramedial abdominal realizada a la altura de las dos últimas mamas. Una vez exteriorizado el útero y los ovarios, se procedió a la evaluación morfológica de estos últimos para determinar el número de cuerpos lúteos presentes en cada ovario. A continuación se realizó el lavado de la región anterior de cada oviducto conjuntamente con la anterior del cuerno uterino correspondiente para la obtención de los embriones. El medio de lavado se recogió en tubos Falcon de 50ml y se depositó en placas de Petri para su visualización. El examen de las estructuras recuperadas (ovocitos y/o embriones) se llevó a cabo bajo un estereomicroscopio de 60x. Se consideró gestante toda cerda en la que se recuperaron más de 4 embriones.

En las cerdas inseminadas por laparoscopia, la fertilidad se evaluó a término, es decir en el momento del parto, considerándose 2 parámetros. Por un lado, el porcentaje de cerdas inseminadas que llegaban al parto y, por otro lado, el número de lechones nacidos por camada.

3.2.6. Determinación de los niveles de cortisol.

Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia. El análisis de cortisol se hizo utilizando un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente en fase sólida (IMMULITE[®] 1000, Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Deerfield, IL, USA) adaptado para saliva de cerdo. Su validez y las características analíticas fueron comprobadas por Fuentes y cols. (2011). En este ensayo, los anticuerpos (anticuerpos-anticortisol policlonales de conejo) son inmovilizados en una fase sólida. Sobre éstos, se depositan los antígenos ligados con la enzima, y también los antígenos libres (la muestra). En este momento, se establece una competición entre los antígenos ligados con la enzima y la muestra. Cuanto mayor sea la cantidad del antígeno que lleva la muestra menor número de antígenos ligados con la enzima se juntarán con los anticuerpos y la cantidad de luminiscencia que se libera será negativamente proporcional a la cantidad del antígeno que lleva la muestra. Una vez terminada la reacción se

eliminan los anticuerpos que no se han ligado mediante lavado de las muestras. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g/dL}$, y con el factor de conversión (27'59) se convierten en nmol/L .

3.3. Diseño experimental

El experimental se ha desarrollado a lo largo de 7 meses (desde octubre de 2010 a abril de 2011) en los que se cuantificaron los niveles en saliva de cortisol a un total de 215 cerdas, todas ellas seleccionadas al azar. El número de muestras de saliva analizadas por cerda varió entre 3 y 6 de acuerdo al experimento realizado. El número de experimentos desarrollados ha sido de 5.

1. Niveles en saliva de cortisol antes, durante e inmediatamente después de un estrés agudo provocado por el freno nasal.

Este experimento, que podríamos considerar como ensayo preliminar, tenía como objetivo evaluar el tiempo de respuesta en niveles de cortisol en saliva frente a un estrés agudo. A un total de 11 cerdas, ubicadas en grupo en un parque, se les realizó la prueba del freno nasal. Prueba consistente en la sujeción del hocico mediante un lazo (**Figura 21**), procedimiento habitualmente empleado para inmovilizar a las cerdas. Al provocar dicha sujeción un estrés agudo, el propósito de este experimento fue evaluar los cambios en los niveles en saliva de cortisol antes, durante y después de la sujeción del hocico. Para ello se recogieron muestras de saliva a los 15-20 min antes de la sujeción, durante la misma (a los 2-3 min de iniciar el procedimiento) y a los 15-20 min después de la misma.



Figura 21. Inmovilización de la cerda mediante la prueba del freno nasal y recogida de muestra de saliva durante dicha inmovilización.

2. Niveles de cortisol en saliva desde el destete hasta después de finalizar el estro.

A un total de 40 cerdas se les recogieron muestras de saliva en 4 momentos diferentes entre el tiempo transcurrido desde el destete hasta el final del primer estro post-destete. Las tomas se realizaron (1) inmediatamente después del destete, (2) 24 h después del destete, (3) 24 h después del inicio del estro y (4) 24 h después de finalizar el estro.

3. Niveles en saliva de cortisol a lo largo del estro.

Para este experimento, se seleccionaron al azar 100 cerdas con el objetivo de recogerles muestras de saliva en 3 tiempos diferentes (cada 24 h) a lo largo del estro para evaluar posibles cambios en los niveles de cortisol durante el tiempo del estro. Dieciséis de las cerdas, por presentar un estro corto y no mostrar signos de estro en el momento de la tercera toma, fueron excluidas del experimento. Por lo tanto, el número final de cerdas en estudio fue de 84.

4. Influencia de los procedimientos de inseminación vía cervical en los niveles de cortisol en saliva.

Un total de 60 cerdas fueron seleccionadas al azar para realizar este experimento destinado a evaluar como la inseminación vía cervical realizada empleando los 3 procedimientos existentes, influye en los niveles de cortisol en saliva. Las cerdas fueron distribuidas al azar en grupos de 20 para cada uno de los 3 procedimientos de inseminación: (1) inseminación intra-cervical (IIC) o también conocida como tradicional o convencional, (2) inseminación intra-uterina (IIU) o también conocida como post-cervical, y (3) inseminación intra-uterina profunda (DUI). Once de las cerdas fueron finalmente retiradas del estudio (4 del grupo IIC, 4 del IIU y 3 del DUI) por concurrir en ellas alguna de las siguientes circunstancias: (a) duración corta del estro (menos de 48 h), (b) problemas en aplomos con dificultad para incorporarse y/o mantenerse en estación, y (c) nerviosismo excesivo. A cada una de las cerdas en estudio se las inseminó 3 veces, a las 0, 24 y 48 h desde el inicio del estro. Para cada una de las inseminaciones, a cada cerda se les recogió 3 muestras de saliva (**Figura 22**) distribuidas de la siguiente manera: (1) 15 min antes de la inseminación, (2) durante la inseminación, y (3) 15 min después de la inseminación. Las muestras se recogieron una vez el catéter de inseminación había sido introducido en el tracto reproductivo de la cerda y se procedía a depositar la dosis de semen. Se eligió este momento de acuerdo a los resultados obtenidos por Norrby y cols. (2008).



Figura 22. Recogida de muestra de saliva en una cerda durante la inseminación.

5. Influencia del protocolo de inseminación laparoscópica en los niveles de cortisol en saliva.

Para este último experimento se seleccionaron, también al azar como en todos los anteriores, un total de 20 cerdas para ser inseminadas mediante la técnica de laparoscopia. Dos de las 20 cerdas inicialmente seleccionadas fueron rechazadas del estudio al haber ovulado antes del momento previsto, lo cual las hacía no válidas para ser sometidas a la inseminación. A las restantes 18 cerdas se les recogieron 5 muestras de saliva a los siguientes momentos: (1) momentos antes de inyectarles el sedante, (2) transcurridos unos 5 min de la aplicación del sedante y durante la sujeción con el lazo, momento previo a la aplicación del anestésico en vena, (3) al finalizar la laparoscopia, aproximadamente 40 min después de la sedación (**Figura 23**), (4) a los 80 min de la sedación, momento en el que la cerda ya se despertaba de la anestesia, y (5) a los 120 min después de la sedación, momento en el que la cerda ya totalmente despierta era llevada al estabulado.



Figura 23. Recogida de muestra de saliva en una cerda después de la laparoscopia y todavía bajo los efectos de la anestesia.

3.4. Análisis estadísticos

Para analizar los datos obtenidos en los diferentes experimentos se utilizó el programa estadístico SPSS (versión 15.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Inicialmente se comprobó la distribución de los datos mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov, realizándose una transformación logarítmica de aquellos que no seguían una distribución normal. Se realizaron Análisis de Varianza (ANOVA) de una, dos o tres vías, según el experimento, para determinar el efecto de la toma de muestra sobre los niveles de cortisol. Los resultados se expresan en diagramas de cajas y bigotes, y como media \pm error estándar de la media (sem). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para una $P < 0'05$.

Capítulo IV: RESULTADOS

4.1. Niveles en saliva de cortisol antes, durante e inmediatamente después de un estrés agudo

La sujeción del hocico mediante un lazo, denominado freno nasal y usado para inmovilizar a las cerdas, provoca un súbito y significativo ($P < 0'01$) incremento de los niveles de cortisol en saliva ($5'79 \pm 0'71$) respecto a los cuantificados 15-20 min antes ($2'63 \pm 0'26$). Niveles que desciende dentro de los siguientes 15-20 min posteriores hasta valores basales ($2'57 \pm 0'25$), considerando como tales a los que se observaban en las muestras de saliva recogidas entre 15 y 20 min antes de la sujeción (**Figura 24**).

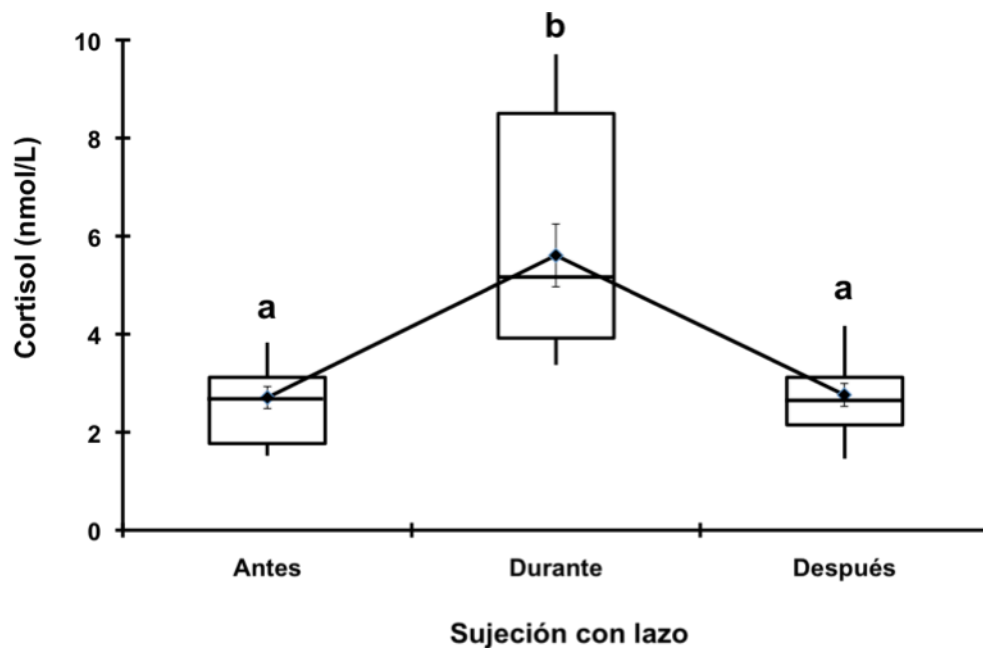


Figura 24. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva de cerdas estabuladas en parques ($n^{\circ} = 11$) y recogidas a los 15-20 min antes, durante y 15-20 min después de la sujeción del hocico mediante un lazo. Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea continua dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (\pm sem) a lo largo de los tres tiempos de cuantificación. a,b indica diferencias entre tiempos para $P < 0'01$.

4.2. Niveles de cortisol en saliva desde el destete hasta después de finalizar el estro

Los niveles de cortisol varían significativamente ($P < 0'001$) entre los 4 estadios fisiológicos (**Figura 25**). Los niveles más elevados se cuantifican en las muestras recogidas en el destete ($15'72 \pm 1'53$) y los más bajos en las recogidas a las 24 h post-destete ($5'14 \pm 0'33$) y a las 24 h post-estro ($4'37 \pm 0'33$). Durante el estro, los niveles de cortisol ($7'97 \pm 0'45$) son más elevados que en el post-destete y post-estro, pero mucho más bajos que los cuantificados en el destete. Destacar la variabilidad entre cerdas en los niveles de cortisol cuantificados en el destete (36'98 para el percentil 95 y 2'92 para el percentil 5).

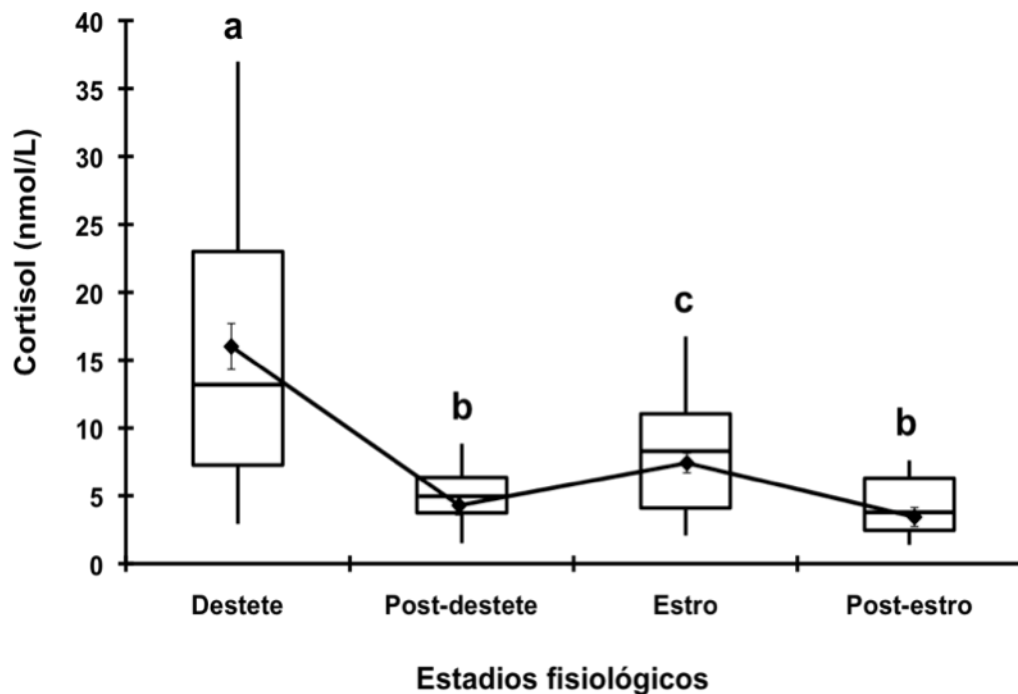


Figura 25. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva recogidas en cerdas ($n^{\circ} = 40$) al destete, 24 h post-destete, durante el estro y 24 h post-estro. Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea continua dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (\pm sem) a lo largo de los tres tiempos de cuantificación. a-c indica diferencias entre estadios fisiológicos para $P < 0'01$.

4.3. Niveles en saliva de cortisol a lo largo del estro

Los niveles de cortisol en saliva fueron cuantificados cada 24 h en cerdas que mostraron signos de estro durante 3 d (**Figura 26**). Dichos niveles muestran diferencias significativas ($P < 0'001$) entre los 3 d. Los valores más altos se recogieron durante el primer día ($8'76 \pm 0'74$) y los más bajos durante el segundo ($5'77 \pm 0'41$), situándose los del tercer día en un término medio ($8'28 \pm 0'38$). Destacar también la amplitud de rango en dichos niveles, particularmente durante el primer día (21'76 para el percentil 95 y 1'38 para el percentil 5).

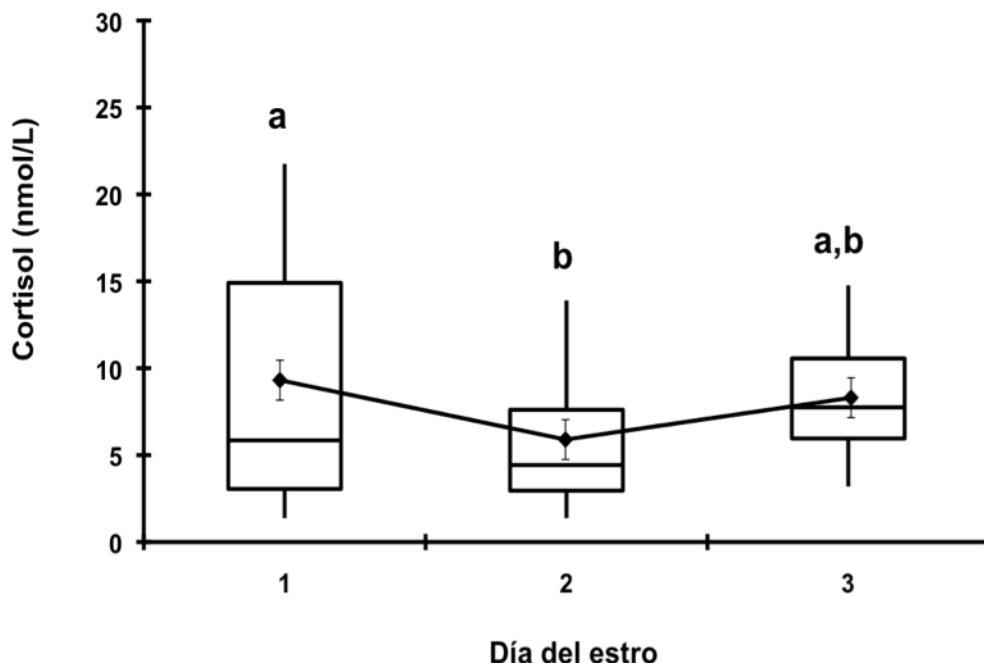


Figura 26. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva recogidas en cerdas ($n^{\circ} = 84$) que mostraron signos de estro durante 3 d. Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea continua dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (\pm sem) a lo largo de los tres tiempos de cuantificación. a,b indica diferencias entre los días del estro para $P < 0'01$.

4.4. Influencia de los procedimientos de inseminación vía cervical en los niveles de cortisol en saliva

Las cerdas inseminadas con procedimientos vía cervical lo fueron 3 veces por estro empleando el procedimiento tradicional (inseminación intra-cervical), post-cervical (inseminación intrauterina) y el denominado inseminación intrauterina profunda. Tal y como se

RESULTADOS

representa en la **Figuras 27, 28 y 29**, los niveles de cortisol medidos en el momento de la inseminación se comparan con los medidos 15 min antes y 15 min después de la inseminación, para cada una de las 3 inseminaciones realizadas a lo largo del estro. No se observaron diferencias significativas ($P > 0'05$) entre los 3 tiempos para ninguno de los 3 procedimientos de inseminación. Tampoco hubo diferencias entre procedimientos de inseminación ($P > 0'05$). Destacar que, aún cuando las cerdas fueron distribuidas al azar entre los 3 procedimientos de inseminación, aquellas que fueron inseminadas empleando la IIU o la DUI mostraron un rango mayor en los niveles de cortisol ya antes de la primera inseminación lo que repercutió en los rangos observados durante y después de las inseminaciones. Dicha mayor amplitud de rango fue más evidente durante la primera de las inseminaciones. En la **Tabla 3** se muestra los valores medios de cortisol cuantificados antes, durante y después de las inseminaciones.

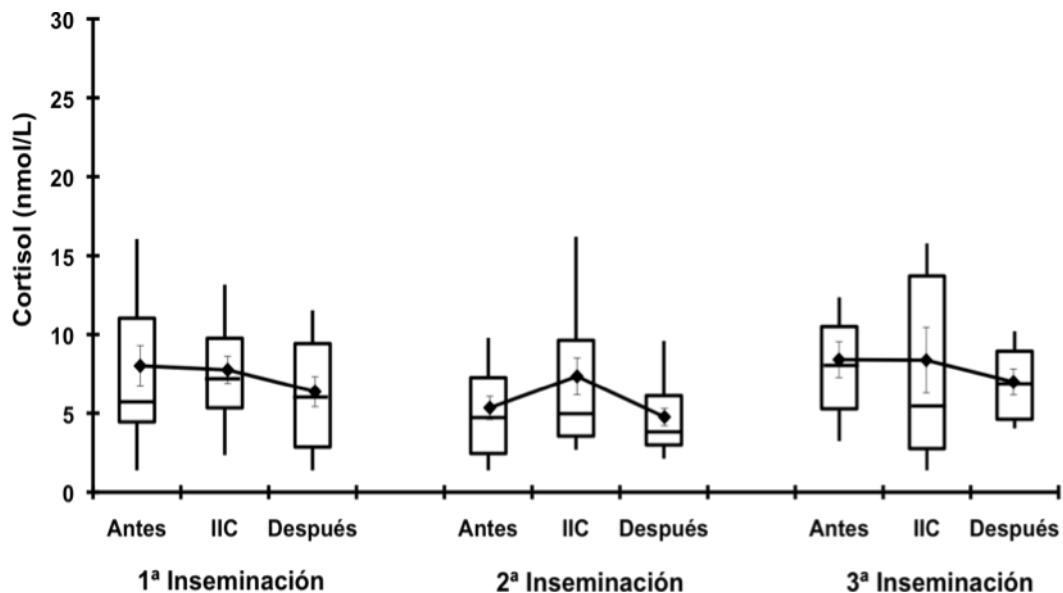


Figura 27. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva recogidas en cerdas ($n^{\circ} = 16$) antes (15 min), durante y después (15 min) de cada una de las inseminaciones realizadas con el procedimiento denominado convencional o intra-cervical (IIC). Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea continua dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (\pm sem) antes, durante y después de cada una de las inseminaciones.

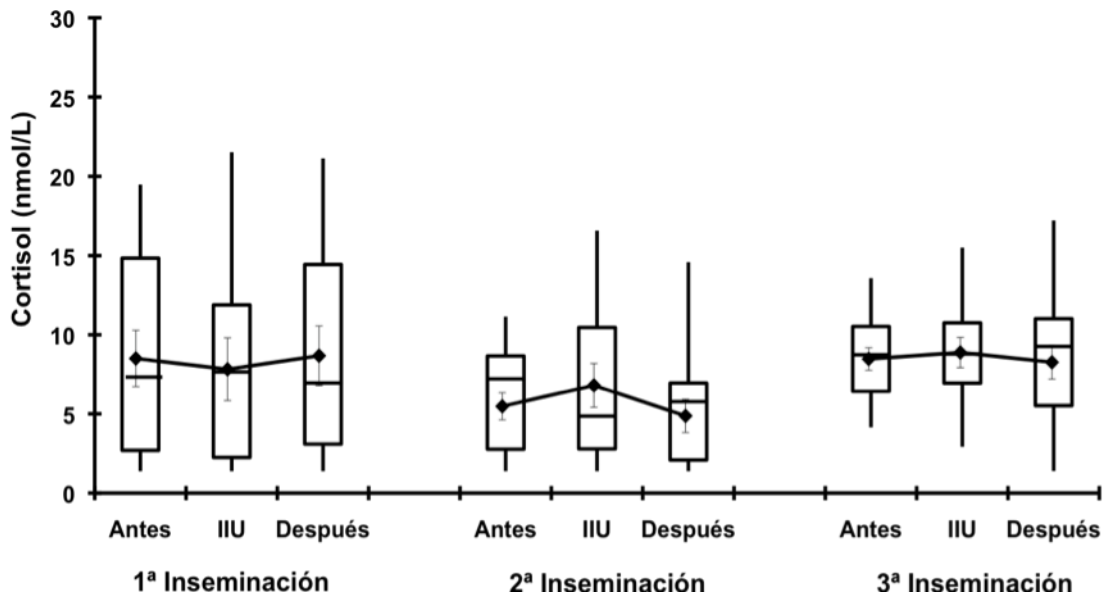


Figura 28. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva recogidas en cerdas ($n^{\circ} = 16$) antes (15 min), durante y después (15 min) de cada una de las inseminaciones realizadas con el procedimiento denominado post-cervical o intra-uterina (IIU). Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea continua dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (\pm sem) antes, durante y después de cada una de las inseminaciones.

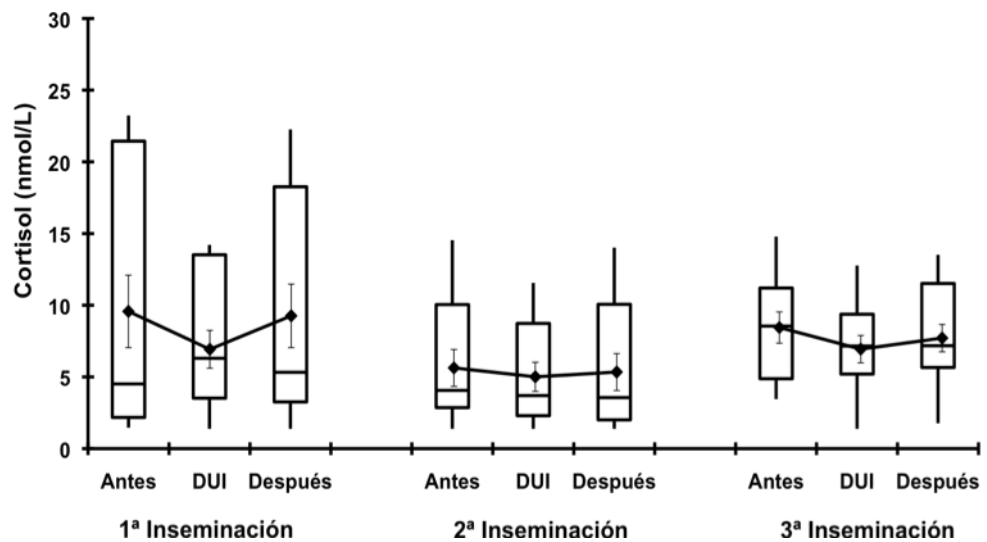


Figura 29. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva recogidas en cerdas ($n^{\circ} = 17$) antes (15 min), durante y después (15 min) de cada una de las inseminaciones realizadas con el procedimiento denominado intrauterina profunda (DUI). Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea continua

RESULTADOS

dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (\pm sem) antes, durante y después de cada una de las inseminaciones.

Tabla 3. Cantidades medias (\pm sem) de cortisol cuantificadas antes (15 min), durante y después (15 min) de las inseminaciones realizadas por vía cervical.

| Procedimiento de inseminación | Nº Cerdas | Cortisol (nmol/L) | | |
|-------------------------------|-----------|-------------------|-----------------|-------------------|
| | | 15 min antes IA | Durante IA | 15 min después IA |
| Intra-cervical | 16 | 6'77 \pm 0'60 | 7'40 \pm 0'65 | 5'68 \pm 0'44 |
| Intra-uterina | 16 | 7'73 \pm 0'66 | 8'06 \pm 0'79 | 7'53 \pm 0'76 |
| Intra-uterina profunda | 17 | 8'13 \pm 0'89 | 6'79 \pm 0'56 | 7'78 \pm 0'80 |

4.5. Influencia del protocolo de inseminación laparoscópica en los niveles de cortisol en saliva

Los niveles salivares de cortisol fueron cuantificados a diferentes momentos del protocolo, coincidentes con el momento de la sedación (15 min antes de la sujeción con el lazo), durante la sujeción y a los 40, 80 y 120 min después de la sedación, que coincidía con el final de la laparoscopia, el despertar de las cerdas y su incorporación para su traslado a los estabulados, respectivamente. Como queda reflejado en la **Figura 30**, hubo diferencias significativas ($P < 0'001$) entre los diferentes momentos contemplados en el protocolo de laparoscopia. Los niveles más bajo, y no diferentes entre sí, se cuantificaron en el momento de la sedación ($4'07 \pm 0'47$), de la sujeción ($5'41 \pm 0'64$) y a los 120 min después de la sedación ($6'08 \pm 1'01$). Los niveles más altos y tampoco diferentes entre sí pero diferentes de los anteriores, se cuantificaron a los 40 y 80 min post-sedación ($11'07 \pm 1'10$ y $12'47 \pm 1'58$, respectivamente).

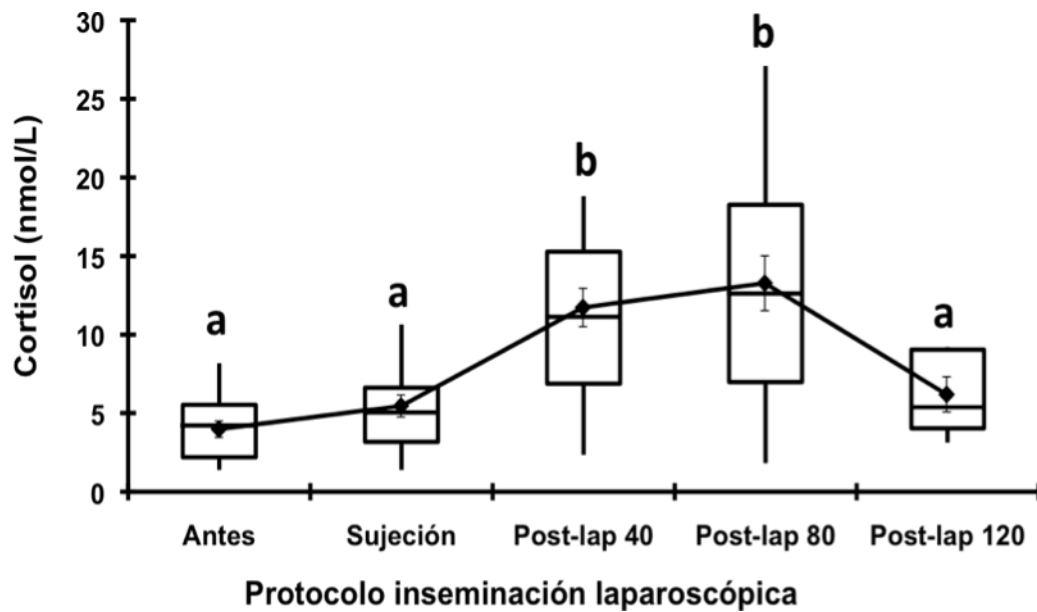


Figura 30. Diagramas de cajas y bigotes mostrando los niveles de cortisol cuantificados en muestras de saliva recogidas en cerdas ($n^{\circ} = 18$) sometidas a inseminación artificial a través de laparoscopia. Las muestras de saliva fueron recogidas momentos antes de la sedación (antes), durante la sujeción mediante lazo (sujeción) y a los 40 (Post-lap40), 80 (Post-lap80) y 120 min (Post-lap120) post-sedación, tiempos éstos que coincidían con el final de la laparoscopia, el despertar de la anestesia y la incorporación de la cerda, respectivamente. Las cajas representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95. La línea continua dentro de las cajas representa la mediana. La línea entre cajas representa la evolución de la media (\pm sem) antes, durante y después de cada una de las inseminaciones. a,b indica diferencias entre los días del estro para $P < 0'01$.

4.6. Relación entre los niveles salivares de cortisol y los parámetros de fertilidad

En la **Tabla 4** se recoge el resumen de los parámetros de fertilidad recogidos en las cerdas inseminadas. Las cerdas inseminadas empleando procedimientos vía cervical quedaron todas gestantes, mientras que en aquellas inseminadas vía laparoscopia hubo 4 de las 18 (22'22%) que repitieron estro a los 19-28 d post-inseminación. Destacar que en 1 de las 48 inseminaciones intra-cervical se observó sangre en el catéter al finalizar la inseminación. Otro tanto ocurrió en 3 de las 51 inseminaciones intrauterina profundas.

Respecto a posibles relaciones entre los parámetros de fertilidad y los niveles de cortisol cuantificados, es obvio, a tenor de los resultados de fertilidad, que los niveles de cortisol medidos no condicionaron la fertilidad en las cerdas inseminadas vía cervical. Con relación a las

RESULTADOS

cerdas inseminadas por laparoscopia, las 2 cerdas que mostraron de manera repetida en las 4 valoraciones (excluyendo la primera de las 5) los niveles más elevados de cortisol quedaron gestantes y parieron 9 y 11 lechones. Respecto a las 4 cerdas no gestantes, una de ellas mostró niveles elevados de cortisol en las 4 valoraciones. Otras 2 mostraron niveles medios y la cuarta niveles muy bajos. En cuanto a la presencia de sangre en el catéter de inseminación observado en 4 inseminaciones realizadas vía cervical, destacar que 3 de dichas inseminaciones coincidieron con niveles elevados de cortisol (superiores a 15 nmol/L). De hecho en las cerdas que ocurrió dicha circunstancia, los niveles más elevados de cortisol se observaron precisamente en las inseminaciones donde apareció la sangre al retirar el catéter de inseminación.

Tabla 4. Parámetros de fertilidad en cerdas inseminadas (IA) empleando diferentes procedimientos de inseminación.

| Procedimiento de IA | Nº de cerdas | Parámetros de fertilidad | | | Nº de IAs con sangre ³ (%) |
|------------------------|--------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| | | Nº Gestantes (%) | Nº Parto (%) | Nº Lechones (media±sem) | |
| Intra-cervical | 16 | 16 ¹ (100) | 16 ¹ (100) | 465 ² (29'07±3'15) | 1/48 (2'08) |
| Intra-uterina | 16 | 16 ¹ (100) | 16 ¹ (100) | 661 ² (41'33±3'86) | 0/48 (0) |
| Intra-uterina profunda | 17 | 17 ¹ (100) | 17 ¹ (100) | 576 ² (33'88±3'11) | 3/51 (5'88) |
| Laparoscopia | 18 | 14 (77'78) | 14 (77'78) | 129 (9'21±0'61) | |

¹Recogida quirúrgica de embriones a los 6 días del inicio del estro

²Número de embriones recogidos

³Presencia de sangre en el catéter de inseminación

Capítulo V: DISCUSIÓN

En este estudio el principal resultado que se aporta es que el nivel de cortisol, como indicador del estrés agudo que se genera en los animales, durante la inseminación por vía cervical, independientemente del procedimiento empleado, no aumenta respecto al que ya de por sí tienen las cerdas durante el estro. Además, este estudio demuestra por primera vez que la aplicación de la inseminación intrauterina profunda no implica una situación estresante en las cerdas y que la inseminación por laparoscopia, si bien eleva los niveles de cortisol temporalmente, tampoco induce situaciones de estrés que comprometan la capacidad reproductiva de las cerdas.

Se sabe que la evaluación del estrés en saliva es un método válido y no invasivo en porcino (Cook y cols., 1996; Weston, 2009). Además, al ser un método no invasivo, la toma de muestra no genera estrés adicional, no altera el bienestar animal y por ello los resultados obtenidos reflejan mejor la situación real de estrés del individuo. No obstante, deben ser considerados algunos aspectos relacionados con la técnica que pueden falsear los resultados. Por ejemplo, el procedimiento de recogida de muestra y la manipulación posterior de la misma, pueden influir en los resultados (Lewis, 2006). En el presente estudio estas variables han sido tenidas en cuenta a la hora de establecer los protocolos de trabajo, los cuales siguieron los procedimientos descritos por Gutiérrez y cols. (2009). El procedimiento descrito para la toma de muestras de saliva y manipulación de la misma en este estudio ha demostrado ofrecer niveles de cortisol comparables a cuando las muestras son tomadas desde plasma sanguíneo (Cook y cols., 1996; Weston, 2009). En este estudio, se usó la saliva para medir el nivel de cortisol, esto se ha respaldado y sigue respaldando hoy en día más por las razones que hemos nombrado en los apartados anteriores. Desarrollando este trabajo le daríamos una gran evaluación al uso de saliva como muestra para detectar el estrés, la experiencia personal que hemos tenido durante este periodo también hemos comprobado que es un procedimiento fácil de aplicar. Lo que destacaríamos durante nuestra experiencia es que en la mayoría de las cerdas el flujo de saliva fue suficiente y no hubo dificultades en recoger las muestras. Si el flujo de saliva era menor, hecho que sucedió en pocas cerdas, se compensaba con un mayor tiempo de recogida, aunque nunca fueron necesarios tiempos de recogida superiores a 1.5 min. Lo que fue interesante es que en la mayoría de las cerdas después de las primeras recogidas, en las siguientes fue más fácil tomar las muestras de saliva. Esto se podría explicar por el proceso de adaptación y acostumbramiento que pasan las cerdas. Este hecho podría ser un buen inicio para otros estudios relacionados con la etología de los animales.

La elevación puntual de cortisol en sangre y saliva es considerada un indicador de estrés agudo (Mostl y Palme, 2002). Esto hecho queda demostrado en nuestro estudio en el experimento preliminar en el que se inmovilizaban los animales mediante el freno nasal, considerado un

procedimiento eficaz para provocar un estrés agudo en cerdas (Becker y cols., 1985). Se ha visto que la prueba del freno nasal, al provocar un estrés agudo, induce un aumento de los niveles de cortisol dentro de los primeros 15 min desde el inicio de la sujeción (Farmer y cols., 1991; Parrot y Lloyd, 1994). Este estudio preliminar tuvo especial relevancia para nosotros ya que nos demostraba que los niveles de cortisol en saliva se elevan de forma significativa en respuesta al efecto estresante, y que dichos niveles caían de forma drástica regresando, pasados 15-20 min, a los niveles existentes antes del estrés. Esta dinámica en los niveles de cortisol se corresponde con el patrón de estrés agudo (Prunier y cols., 2005; von Borell y Ladewig, 1989 ; Neubert y cols., 1996). Los resultados de esta prueba preliminar fueron de especial ayuda para establecer las pautas de toma de saliva que deberíamos seguir a largo del estudio.

Nuestros resultados demuestran la existencia de una gran variabilidad en los niveles de cortisol entre cerdas en la respuesta a las hipotéticas situaciones de estrés durante el manejo reproductivo, hecho también comprobado anteriormente por Soede y cols. (2007). Así por ejemplo, el episodio de manejo reproductivo que mas estrés produce, según las mediciones de cortisol obtenidas de las muestras de saliva, es el destete. Este hecho, el estrés que ocasiona el destete en porcino, ya fue puesto en evidencia con anterioridad (Tsuma y cols., 1995). Esto autores observaron un aumento significativo de cortisol en plasma en las horas siguientes a la retirada de los lechones, observando así mismo un gran variabilidad entre animales. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio y demuestran que el estrés provocado por el destete como paso fundamental en el manejo reproductivo porcino y evaluado en función del aumento de cortisol depende en gran medida del individuo. Esta variabilidad individual en el presente estudio también se observa en las otras etapas de manejo reproductivo evaluadas, particularmente al inicio del estro y después de la intervención laparoscópica. Esta variabilidad individual, que está relacionada con el estado metabólico, salud, edad, diferencia individual, madurez sexual, intensidad y duración del estrés y la raza de cerdo (Einarsson y cols., 2008; Wise y cols., 2001), debería ser tomada en cuenta cuando se pretende evaluar el estrés que determinadas situaciones de manejo pueden suponer. Por ejemplo, en nuestro estudio las cerdas fueron distribuidas al azar entre los diferentes procedimientos de inseminación, sin embargo aquellas que fueron destinadas a la DUI mostraron niveles más elevados de cortisol antes de la primera inseminación comparado con aquellas otras destinadas a IIC e IIU. Hecho éste totalmente ajeno a la propia inseminación, pero que podría condicionar los resultados obtenidos durante las inseminaciones.

Aunque la principal idea de este trabajo fue hacer un estudio para aclarar las incertidumbres sobre el estrés que se produce durante los distintos procedimientos de inseminación, entendemos

que la influencia estresante que pueden ocasionar dichos procedimientos debería ser contextualizada en el manejo reproductivo que se hace en las cerdas. Así por ejemplo pueden existir diferencias en el estrés que sufran las cerdas primíparas respecto al que puedan sufrir las cerdas destetadas o incluso las cerdas repetidoras. Aunque esto no ha sido evidenciado en porcino, estudios en yeguas si demuestran la existencia de diferencias en los niveles de cortisol según la condición reproductiva de las hembras (Berghold y cols., 2007). Por lo tanto en el presente estudio, además de cuantificar los niveles de cortisol durante las inseminaciones, hemos querido también cuantificar dichos niveles en tiempos antes y después de las mismas, incluyendo desde el destete hasta después del estro.

Está bien demostrado que el destete es un momento de estrés para las cerdas, observándose un aumento significativo de cortisol (Ash y Heap, 1975; Neuton y cols., 1987; Wise y cols., 2001; Hulten y cols., 2002). El estrés que se produce durante el destete se podría explicar como un estrés de tipo psicológico que se acompaña con un subida elevación del nivel cortisol en los momentos posteriores a la separación de la cerda de sus lechones, elevación respecto a los ya de por si niveles elevados de cortisol que tiene la cerda durante la lactación, debido al amamantamiento de los lechones (Rojkittikhun y cols., 1991). Durante nuestro estudio los niveles de cortisol el día del destete fueron más altos que 24 h después del destete y más altos que los observados al estro y después del estro. Nuestros valores en el momento del destete son semejantes con los observados por Wise y cols. (2001) y de Ash y Heap (1975). Después de 24 h del destete el nivel de cortisol desciende, esto se podría explicar por la falta de los factores que concurren durante el destete y por el hecho que el estrés que se provoca durante el destete es de tipo agudo, y como se sugiere en distintos trabajos que durante el estrés agudo el nivel de cortisol vuelve a bajar en pocas horas hacia los niveles normales (Newton y cols., 1987; Tsuma y cols., 1995; Turner y cols., 1998).

Como hemos comentado los niveles de cortisol descienden 24 h después del destete pero vuelven a aumentar cuando la cerda entra en estro, situación que suele ocurrir entre los 3 y 7 días después del destete (Soede y cols, 1997). Durante este periodo transitorio entre el destete y el inicio del estro los niveles de cortisol son muy bajos, los más bajos obtenidos en este estudio. Niveles que además se caracterizan por ser poco variables entre cerdas. Estos hechos se podrían explicar porque es probablemente el periodo de tiempo en que las cerdas no experimentan cambios funcionales relacionados con la reproducción que exijan su manipulación. Podríamos decir que se encuentran en un periodo de espera, por lo tanto podríamos interpretar los niveles de cortisol medimos en este momento como niveles basales.

Siguiendo nuestro experimento, los valores de cortisol vuelven a aumentar otra vez durante el estro. Esto se podría explicar como consecuencia de una supuesta interacción entre los ovarios y las glándulas adrenales donde se ha visto que el aumento de los estrógenos se acompaña con el aumento del cortisol y por el estado de excitación que tienen las cerdas durante el estro (McGuire y cols., 1975). Otra explicación que se les daría el aumento de cortisol durante el estro podría ser por el efecto del verraco que se usa durante la detección del estro. Se ha visto que la exposición al verraco conlleva un aumento de los niveles de cortisol (Newton y cols., 1987). Al terminar el estro los valores de cortisol vuelvan a bajar, lo cual ya ha sido descrito con anterioridad (Ash y Heap, 1975). Esto debido al regreso del animal a condiciones normales de mínima manipulación, donde faltarían las causas que provocan la elevación del cortisol y estamos en un estadio de “tranquilidad fisiológica” donde el nivel de estrógenos es bajo. La hormona que domina el periodo después del estro es la progesterona, hormona con propiedades anti estresantes tal y como se ha demostrado en la especie humana (Tarin y cols., 2010).

Aunque existen numerosos estudios sobre los patrones de hormonas como FSH, LH o estrógenos durante el estro (Razdan y cols., 2002; Lang y cols., 2004) y el efecto que determinados factores estresantes pueden tener sobre estos patrones, no existe apenas información sobre la dinámica de los niveles de cortisol durante este periodo de estro. En un estudio de Turner y cols. (1998) se observa que el cortisol se sitúa en niveles elevados el primer día del estro y va disminuyendo progresivamente hasta el tercer día. Pero esto no ocurre en el estudio hecho por Kunavongkrit y cols. (1998), donde se observa un aumento del nivel de cortisol el tercer día del estro. Este último patrón, es decir niveles elevados de cortisol el primer día del estro, un descenso durante el segundo día y una nueva elevación de dichos niveles durante el tercer día, ha sido observado también en nuestro estudio, aunque la elevación en los niveles de cortisol observados en el tercer día no diferían de los observados durante el segundo día. Las razones que explicarían los cambios en los niveles de cortisol durante el estro no están recogidas en los estudios arriba mencionados, probablemente porque ello no era el objetivo primario del estudio. Hasta donde nosotros conocemos no existen estudios que expliquen las razones de dichos cambios. En nuestra opinión y siempre como hipótesis no sustentadas en sólidas evidencias, podríamos considerar que los niveles altos de cortisol observados durante el primer día del estro estarían relacionados con los repentinos cambios psicossomáticos que experimentan las cerdas, cambios acompañados por unos niveles altos de estrógenos (Henricks y cols., 1972; Stanchev y cols., 1985). El descenso de los niveles de cortisol durante el segundo día del estro podría relacionarse porque durante dicho día en una importante proporción de las cerdas se produce o ya se ha producido la ovulación, con la consiguiente inversión del cociente estrógenos/progesterona. En cuanto al ligero, pero evidente,

incremento del cortisol durante el tercer día del estro, un patrón similar, con un ligero aumento del nivel de cortisol después de 36 h del inicio del estro, fue observado por Ash y Heap (1975) y tendencias semejantes ocurrieron en el estudio hecho por Almond y Dial (1990). Ningún de estos dos estudios aclara o sugiere las razones de dicho patrón. Los niveles de cortisol a lo largo de un día de estro en la cerda siguen un ritmo circadiano (Almond y Dial, 1990), el cual también ha sido comprobado en vacas (Lyimo y cols., 2000), y por lo tanto difieren a lo largo del día. Este hecho no explicaría los cambios observados en dichos niveles entre días del estro en nuestro estudio ya que la toma de las muestras de saliva se realizó en el mismo momento del día a lo largo de los tres días de estro. Entonces, al no existir explicación de estos cambios y aunque pensamos que también podría estar relacionado con otros cambios hormonales, serían necesarios nuevos estudios que, primero, confirmaran dicho patrón en un número mayor de cerdas y, segundo, evaluaran simultáneamente otros cambios hormonales buscando posibles relaciones entre dichos cambios y los experimentados por los niveles de cortisol.

En cuanto al efecto de la inseminación sobre los niveles de cortisol en la cerda, apenas existe un estudio, realizado en Suecia, en el que comparan dichos niveles entre cerdas sometidas a monta natural y a inseminación mediante IIC o IIU (Norrby y cols., 2007). En este estudio, el procedimiento de inseminación se iniciaba con una fase de estimulación, bien por el verraco bien por el operario, que duraba 4 min, para, a continuación, inserta el catéter y proceder con la inseminación. Sus resultados demostraban un incremento de los niveles de cortisol entre los minutos 5 y 10 desde el inicio del procedimiento de inseminación. Tiempo que coincide con el hecho físico de la inseminación propiamente dicha, si tenemos en cuenta que la inseminación suele durar más de 5 min (Roca y cols., 2006). En contraste, nosotros no hemos encontrado que la inseminación vía cervical, independientemente del procedimiento usado, induzca incrementos significativos de los niveles de cortisol, medidos en ese mismo tiempo de la inseminación, respecto a las mediciones realizadas minutos antes de la inseminación. Esta diferencia entre los resultados de Norrby y cols. (2007) y los nuestros podría estar asociada al estímulo realizado antes de la inseminación propiamente dicha en el estudio sueco. En este sentido se ha demostrado que el estímulo del verraco sobre la cerda durante el estro produce en ella un incremento de los niveles de cortisol (Turner y cols., 1998). Además, estos mismos autores suecos indican que los niveles más elevados de cortisol los presentan las cerdas que fueron cubiertas por el verraco, lo cual reforzaría nuestra hipótesis de que el incremento de los niveles de cortisol más que a la inseminación serían debidos a la influencia del estímulo antes y durante la inseminación. En nuestro estudio, quizás porque no es costumbre en España, las cerdas no estuvieron sometidas a ningún estímulo antes y durante la inseminación. Lo cual nos permitió valorar más objetivamente el efecto de la inseminación por vía

cervical sobre los niveles de cortisol. Además, en nuestro estudio, las cerdas fueron inseminadas 3 veces a lo largo del estro, y en ninguna de las inseminaciones los niveles de cortisol fueron superiores a los cuantificados antes y después de cada inseminación. Incluso, en algunas inseminaciones, la variabilidad entre cerdas en los niveles de cortisol durante la inseminación, fue menor que antes y después de las inseminaciones.

Las técnicas de inseminación en la especie porcina han experimentado un gran avance tecnológico durante los últimos años, particularmente por la incorporación de nuevos procedimientos de inseminación como la IIU y la DUI. Estos nuevos procedimientos implican una mayor invasión del tracto reproductivo de la cerda, facilitando la deposición de los espermatozoides más cerca del lugar de fecundación (Roca y cols., 2006). A pesar de su reconocida eficacia (Vázquez y cols., 2008), se sigue debatiendo en algunos foros científicos sobre un posible efecto traumático de dichos procedimientos en la mucosa uterina (Bathgate y cols., 2005). Es plausible que si dichos procedimientos no se manejan correctamente puedan dañar el tracto reproductivo, enfatizando la necesidad de un cierto entrenamiento en su manejo antes de ser empleados (Roca y cols., 2011). Nuestro estudio pone claramente en evidencia que cuando dichos sistemas son empleados correctamente no implica un estrés agudo añadido. Si es verdad que en algunas inseminaciones, independientemente del procedimiento empleado, se pudo observar al retirar el catéter sangre en la punta del mismo, en concreto en 4 inseminaciones de las 147 realizadas, indicativo de posible daño en la mucosa. Hecho éste que implicó, en 3 de las 4 inseminaciones, niveles relativamente altos de cortisol. Esto se respalda por otros estudios donde los procedimientos con dolencia y traumáticos se acompañan con un aumento de los niveles de cortisol (Zhou y cols., 1999; Sylvester y cols., 1998). Sin embargo y a tenor de los resultados de fertilidad, la presencia de sangre en la punta del catéter y su respuesta en un incremento en los niveles de cortisol no comprometió la fertilidad en las cerdas. En cualquier caso los niveles de cortisol cuantificados en las muestras de saliva de las cerdas inseminadas vía cervical en nuestro estudio, independientemente del método de inseminación utilizado, fueron siempre relativamente bajos y no diferentes de aquellos observados antes de las inseminaciones. Siendo esto relevante, indicaría que el nivel de estrés que se produce con estas técnicas es bajo a pesar de que pudieran parecer técnicas de inseminación traumáticas para la cerda, particularmente la IIU y la DUI. Demostrar la ausencia de un estrés añadido es un gran avance desde el punto de vista del bienestar animal.

El hecho que la inseminación vía cervical, independientemente del procedimiento empleado, no produzca un estrés añadido, además de explicarse por la ausencia de un efecto traumático relevante durante la inseminación, también podría asociarse a que las cerdas estaban habituadas al

manejo que implica este tipo de inseminaciones ya que eran multíparas sujetas a un manejo intensivo y habían sido inseminadas con dichos procedimientos varias veces anteriormente, lo que implica que las cerdas estaban acostumbradas a dicho manejo y por lo tanto no representaba una situación estresante. Niveles bajos de cortisol durante la inseminación también han sido cuantificados con anterioridad en otros estudios (Macalay y cols., 1986; Norrby y cols., 2007).

Además de las nuevas técnicas de inseminación vía cervical, en los últimos años se han desarrollado otras técnicas con la finalidad de poder inseminar con un número reducido o muy reducido de espermatozoides en la especie porcina. Estas técnicas resultan de gran utilidad cuando se van a realizar inseminaciones con espermatozoides sometidos a tratamientos biotecnológicos como son la criopreservación y/o la separación de espermatozoides X e Y por citometría de flujo. En este sentido, la deposición de un reducido número de espermatozoides directamente en el oviducto y/o cuerno uterino próximo a la unión útero-tubárica utilizando un procedimiento quirúrgico de mínima invasión como es la laparoscopia ha sido empleado con éxito en la especie porcina (García y cols., 2007; Vázquez y cols., 2008). Debido a la importancia que este método de inseminación puede tener en la aplicación práctica de determinadas biotecnologías espermáticas en producción porcina es necesario, desde nuestro punto de vista, evaluar el efecto estresante que puede representar en los animales sometidos al mismo. En relación con el nivel de cortisol durante la inseminación por laparoscopia, como en las otras nuevas técnicas de inseminación, existe una falta de información y estudios específicos sobre este tema. Sin embargo lo que sí se sabe, en función de estudios realizados en diferentes especies de mamíferos: porcino, Burpee y cols., 2002; canina, Naitoh y cols., 2002, humana, Nguyen y cols. 2002), es que una intervención laparoscópica produce un nivel de estrés más bajo, aunque no significativamente, que el producido por una intervención de cirugía abierta (laparotomía). Además los autores arriba mencionados describen una disminución más rápida de los niveles de cortisol post-intervención en los animales operados por laparoscopia respecto a los sometidos a laparotomía. En nuestra prueba se midió el nivel de cortisol durante las diferentes etapas necesarias para llevar a cabo la inseminación por laparoscopia en cerdas. Así, se hicieron determinaciones de niveles de cortisol antes de empezar con la manipulación del animal, después de la sedación durante la sujeción con el lazo y, finalmente, a los aproximadamente 40, 80, y 120 min después de iniciar el protocolo. Los análisis de las muestras de saliva realizados en este experimento mostraron que los niveles más bajos de cortisol correspondían al momento inicial y al momento de la inmovilización. El relativamente bajo nivel de cortisol observado durante la inmovilización, contrasta con los resultados encontrados en este estudio en la experiencia preliminar del freno nasal. Este hecho, puede explicarse por que las cerdas estaban sedadas en el momento de la inmovilización. En este sentido hay que destacar que el agente sedante utilizado en este estudio

es la azaperona, entre cuyas indicaciones de uso se encuentra la inhibición de estrés (Clutton y cols., 1998). Por tanto podemos afirmar que, posiblemente, su acción sedativa minimice el efecto estresante de la fijación con lazo. También tenemos que tener en cuenta que la fijación con lazo, en esta experiencia, duro menos tiempo que en el experimento del freno nasal y cuyos resultados se han descrito anteriormente.

Cuando se analizaron los niveles de cortisol en saliva después de la inseminación por laparoscopia, los resultados mostraron una elevación de dichos niveles post-intervención, a los 40 y 80 min del inicio del protocolo, mientras que a los 120 min los niveles eran similares a los obtenidos antes de iniciar la laparoscopia. El incremento del nivel de cortisol que ocurre a los 40 y 80 min podría deberse a que en estos momentos la cerda empieza a recuperarse de la anestesia, y por tanto a ser más consciente del dolor. Esta asociación entre procesos dolorosos y un aumento del cortisol ha sido descrita por diferentes autores (Gavernik y cols., 1999; Desborough, 2000; Leslie y cols., 2010). Además, este aumento del cortisol podría ser también debido a que en estas etapas de recuperación el animal es capaz de recibir estímulos externos a los cuales no es capaz de responder lo que podría provocar en dicho animal una situación de ansiedad que contribuyera a aumentar los niveles del cortisol. En esta línea, el hecho de que los niveles de cortisol a los 120 min disminuyan podría ser explicado en base a una disminución en el dolor que siente el animal y a su vez en una disminución del estado de ansiedad, ya que en este momento los animales, de forma general, son capaces de levantarse y responder a los estímulos externos. Estos resultados contrastan con los descritos por Burpee y cols. (2002) en un estudio realizado en cerdos sometidos a una biopsia hepática por laparoscopia. Estos autores describen un periodo de 3 h tras la cirugía para que los niveles de cortisol empiezan a bajar y un periodo de 24 h para que estos niveles alcancen valores normales. Estas discrepancias podrían ser debidas a diferencias en las condiciones experimentales relacionadas con el tipo de animales utilizados, con el protocolo anestésico, con los órganos que se manipulan durante la laparoscopia y/o con el tiempo de intervención. En este sentido la toma de biopsias de hígado podría ser una intervención más dolorosa o con una mayor duración que la inseminación intrauterina vía laparoscópica, la cual simplemente implica un pinchazo en el oviducto y/o útero y no precisa más de 15 min de intervención. Resultados similares describiendo tiempos largos de recuperación de los niveles basales de cortisol tras intervenciones por laparoscopia han sido descritos en la especie canina (Naitoh y cols., 2002). Otro factor que influye en el patrón de cortisol después de la cirugía, es el tipo del anestésico empleado en la misma. Se ha comprobado que el uso del isoflurano, utilizado en nuestra experiencia, no deriva en niveles altos de cortisol después de la cirugía (Flezzani y cols., 1986).

Es ampliamente aceptado que el estrés afecta la reproducción, principalmente el estrés crónico (Von Borell y cols., 2007; Einarsson y cols., 2008). Especialmente sensible al estrés es el periodo de tiempo durante el estro, pudiendo afectar al patrón de las hormonas foliculares, a la fecundación y a las etapas iniciales del desarrollo embrionario (Barb y cols., 1982; Turner y cols., 1999b; Einarsson y cols., 2008). Pero para que sus efectos perjudiciales reproductivos sean evidentes es necesario que la situación estresante se prolongue en el tiempo, es decir que sea de tipo crónico (Turner y cols., 2005). En el presente estudio la manipulación aplicada a las cerdas durante las inseminaciones cervicales no derivó en incrementos significativos de cortisol, por lo que podríamos decir que no eran situaciones especialmente estresantes y por lo tanto no provocaban ni un estrés agudo ni crónico. Probablemente ello haya contribuido a los excelentes resultados de fertilidad alcanzados en las cerdas inseminadas vía cervical. En cuanto a las cerdas inseminadas por laparoscopia, si se apreciaba un significativo incremento en los niveles de cortisol a los 40 y 80 min de iniciarse el protocolo, niveles que disminuían significativamente a los 120 min. Este patrón en los niveles de cortisol se corresponde con un estrés agudo, y quizás por ello no tuvo especial trascendencia sobre la fertilidad de las cerdas.

En un momento social en el que el bienestar animal es un tema prioritario, poniéndose en duda la inocuidad de ciertas técnicas o procedimientos empleados sobre los animales, tiene especial relevancia la demostración de que los procedimientos de inseminación hoy en día contemplados para la especie porcina no vulneran dicho bienestar, entendido en términos de provocar situaciones estresantes para los animales, cuando son correctamente aplicadas. Hay que reconocer, no obstante, que un buen uso de estas técnicas es imprescindible para no alterar dicho bienestar, ya que una mala aplicación de las mismas podría ocasionar graves alteraciones funcionales en los animales.

En resumen, de nuestros resultados se desprende que la cuantificación de los niveles de cortisol en saliva es un procedimiento útil para valorar el estrés agudo en cerdas reproductoras. En virtud de los resultados alcanzados, es evidente que el destete es la situación más estresante para las cerdas, incluso superior al estro y a la inseminación, incluida la realizada por laparoscopia. Inseminaciones, particularmente las realizadas por vía cervical, que no implican cambios sustanciales en los niveles de cortisol respecto a los que manifiesta la cerda durante el estro.

Capítulo VI: CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El estrés agudo en las cerdas reproductoras puede ser identificado por la medición de los niveles de cortisol en saliva
2. El destete y en menor medida el estro, producen un incremento notable en los niveles de cortisol en saliva
3. Hay cambio a lo largo del estro en los niveles de cortisol en saliva, siendo éstos mayores al inicio y final del estro.
4. La inseminación por vía cervical, independientemente que el procedimiento empleado sea la intra-cervical, intra-uterina o la uterina profunda, no modifica los niveles de cortisol en saliva existentes durante el estro
5. El protocolo empleado en la inseminación laparoscópica provoca un incremento temporal en los niveles de cortisol en saliva que, sin embargo, no parecen influir en la fertilidad.

Capítulo VII: RESUMEN

RESUMEN

Nuevos procedimientos de inseminación han sido incorporados en los programas de inseminación artificial en la especie porcina. Dichos procedimientos: inseminación intra-uterina (IIU), intra-uterina profunda (DUI) y por laparoscopia (LAP), facilitan la deposición de los espermatozoides más cerca del lugar de fecundación, no obstante implican una mayor invasión del tracto reproductivo de la cerda. A pesar de su eficacia y eficiencia, dicha mayor invasión conlleva la posibilidad de que puedan dañar el tracto reproductivo y por lo tanto provocar estrés en las cerdas. El presente estudio pretende aclarar esta disyuntiva evaluando los niveles de cortisol en la saliva, como marcador de estrés agudo en cerdas (1-6 partos), destetadas e inseminadas ($n^{\circ}= 67$) con el procedimiento tradicional intra-cervical (IIC) y los procedimientos anteriormente mencionados. Antes de ello, los cambios en los niveles de cortisol en la saliva han sido evaluados en cerdas desde el destete hasta el final del primer estro post-destete ($n^{\circ}= 40$), y aquellos que acontecen a lo largo de los días del estro ($n^{\circ} = 84$). El análisis de cortisol se llevó a cabo utilizando un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente en fase sólida (IMMULITE® 1000). Las muestras de saliva se procesaron por cuadruplicado y los resultados se expresaron en nmol/L. Los niveles de cortisol el día del destete fueron más altos ($P < 0'01$) que los observados 24 h después del destete ($P < 0'01$) y durante y después del estro. Además, el estro provocó un incremento ($P < 0'01$) de los niveles de cortisol respecto a las mediciones realizadas antes y después del mismo. Durante el estro (3 días), los niveles de cortisol variaron entre días ($P < 0'01$), observándose los más altos y más bajos durante el primer y segundo día, respectivamente. En cuanto a la influencia de los procedimientos de inseminación vía cervical (IIC, IIU y DUI), ninguno de ellos modificó significativamente ($P > 0'05$) los niveles de cortisol con respecto a los medidos 15 min antes y 15 min después de cada inseminación (3 inseminaciones por estro). En relación a la inseminación LAP, el protocolo seguido (sedación, anestesia, e inseminación) influyó significativamente ($P < 0'01$) en los niveles de cortisol, observándose un incremento de los mismos en las 2 primeras mediciones realizadas después de la inseminación (a los 40 y 80 min tras la sedación). A los 120 min post-sedación los niveles regresaron a los existentes antes de iniciarse el protocolo de inseminación. Todas las cerdas inseminadas vía cervical y 14 de las 18 cerdas (77'78%) inseminadas por LAP quedaron gestantes, no estableciéndose relación entre la fertilidad y los niveles de cortisol medidos durante las inseminaciones. En aquellas inseminaciones realizadas por vía cervical en las cuales el catéter de inseminación presentaba sangre al retirarlo (en 4 de las 147 inseminaciones), se cuantificaron niveles altos de cortisol. En virtud de los resultados alcanzados, es evidente que (1) el destete es un momento estresante para las cerdas, incluso superior al estro y a la inseminación (incluida la realizada por vía laparoscópica); y que (2) la inseminación por vía cervical, independientemente del procedimiento utilizado, no genera un mayor estrés en las cerdas del que ya de per se origina el estro.

SUMMARY

New procedures of insemination have been incorporated into breeding programs of artificial insemination in swine. These procedures: intra-uterine insemination (IUI), intra-uterine depth (DUI) and laparoscopy (LAP), facilitate the deposition of the sperm closer to the site of fertilization, however involve a greater invasion of the reproductive tract of the sow. Despite its effectiveness and efficiency, deep invasion might lead to a damage in the reproductive system thus causing stress in sows. This study aims to clear up this dilemma by evaluating the levels of cortisol, as a marker of acute stress, in the saliva of weaned sows (1-6 parturition) and sows inseminated ($n = 67$) by means of the traditional intra-cervical (IIC) or the previously mentioned procedures. Before that, the changes in the levels of salivary cortisol in sows from weaning until the end of the first estrus after weaning ($n = 40$) and those that occur during the days of estrus ($n = 84$) were evaluated. Cortisol analysis was conducted using a chemiluminescent enzyme immunoassay on solid phase (IMMULITE® 1000). The samples of saliva were processed in quadruplicate and the results were expressed in nmol / L. The levels of cortisol in the day of weaning were higher ($P < 0.01$) than those observed 24 h after weaning, during and after estrus. The estrus increased significantly the cortisol levels ($P < 0.01$) to values higher than those observed before and after it. However, cortisol levels varied significantly ($P < 0.01$) between the 3 days of estrus showing the highest and lowest values during the first and second days, respectively. As for the influence of cervical insemination procedures via ICI, IUI and DUI, none of them changed significantly ($P > 0.05$) the levels of cortisol compared to those measured 15 min before and after each insemination (3 inseminations per estrus). In relation to insemination LAP, the protocol followed (sedation, anesthesia, and insemination) significantly increased ($P < 0.01$) the cortisol levels in the first 2 measurements realized after insemination (40 and 80 min after sedation). However, 120 min after the sedation, the levels of cortisol returned to those observed prior to the start of the insemination procedure. All the sows who were previously inseminated via cervical, and 14 of the 18 (77.78%) inseminated by LAP were pregnant, however, no relationship was established between the levels of cortisol measured during insemination and fertility. In the inseminations conducted by via cervical where the catheter had shown blood withdrawn (in 4 of 147 inseminations), high levels of cortisol were detected. It is concluded that (1) weaning is a stressful period for sows even more stressful than the estrus and insemination (including laparoscopy) periods, and that (2) via cervical insemination, regardless of the procedure used, does not generate a greater stress on sows during estral period.

RÉSUMÉ

De nouvelles procédures d'inseminations ont été intégrées dans les programmes d'insémination artificielle chez les porcs. Ces procédures: insémination intrautérine (IIU), intrautérine profondeur (DUI) et la laparoscopie (LAP), facilitent le dépôt du sperme dans une zone proche du lieu de la fécondation, par ailleurs elles conduisent à une plus grande invasion de l'appareil génital de la truie. Malgré son efficacité et son efficacité, une invasion profonde de l'appareil reproducteur accroît les possibilités de son endommagement et par conséquent engendre un stress chez les truies. La recherche suivante vise à éclaircir cette situation tout en évaluant les niveaux de cortisol, marqueur du stress aigu chez le porc, présent dans la salive des truies sevrées (1-6 livraisons) et de celles inséminées ($n = 67$) par le biais de l'intra-cervicale traditionnel (IIC) et des différentes procédures mentionnées antérieurement. En amont, les changements de niveaux de cortisol dans la salive ont été évalués à partir du sevrage des truies jusqu' à la fin du premier oestrus ($n = 40$) ainsi que ceux survenus au long des différents jours de l'oestrus ($n = 84$). L'analyse de cortisol s'est réalisée en utilisant un dosage immuno-enzymatique chimioluminescence sur phase solide (IMMULITE® 1000). Des échantillons de salive ont été traités en quatre exemplaires et les résultats ont été exprimés en nmol / L. Le jour du sevrage, les niveaux de cortisol examinés ont été plus élevés ($P < 0,01$) que ceux observés 24 h après le sevrage ($P < 0,01$), pendant et après l'oestrus. L'oestrus a entraîné une augmentation ($P < 0,01$) des niveaux de cortisol par rapport aux mesures relevées avant et après ce dernier. Les niveaux de cortisol ont varié significativement pendant les 3 jours de l'oestrus ($P < 0,01$) avec respectivement les valeurs les plus élevées pour le premier et les valeurs les plus basses pour le second. Aucune des procédures d'insémination cervicale via ICI, IIU et la DUI, n' a pu modifier ou influencer d'une manière significative ($p > 0,05$) sur les niveaux de cortisol mesurés 15 min avant et 15 min après chaque insémination (3 inséminations par oestrus). En ce qui concerne l'insémination LAP, le protocole suivi (sédation, anesthésie, et l'insémination) a influencé significativement ($P < 0,01$) sur les niveaux de cortisol, avec une augmentation observée dans les 2 premières mesures réalisées après l'insémination (40 et 80 min après la sédation). 120 min après la sédation les niveaux ont rejoint ceux observés avant le début du protocole d'insémination. Toutes les truies inséminées par via cervical, et 14 truies sur 18 truies (77,78%) inséminées par LAP ont été fécondées. Cependant aucun lien n'a été établi entre la fécondité et les niveaux de cortisol mesurés lors de l'insémination. En ce qui concernent les inseminations effectuées par voie cervicale où le cathéter d'insémination une fois retiré était taché de sang, (dans 4 des 147 inséminations) des niveaux élevés de cortisol ont été mesurés. À partir des résultats obtenus, il est clair que (1) le sevrage est une période stressante pour les truies et comparativement plus stressante que l'oestrus et que l'insémination (compris par laparoscopie) et (2) que l'insémination cervicale, indépendamment de la procédure utilisée, ne génère pas un stress aux truies supérieur en comparaison de celui causé par l'oestrus.

Capítulo VIII: BIBLIOGRAFÍA

Almond, G. W.; Dial, G. D. 1990. Steroid hormone and luteinizing hormone concentrations in the anestrous sow. *Can J Vet Res.* 54(2):209-14.

Antony, F. A. 1993. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotrophic secretion comes of age. *Front Neuroendocrinol.* 14,7-122.

Ash, R. W.; Heap, R. B. 1975. Oestrogen, Progesterone and Corticosteroid Concentrations in Peripheral Plasma of Sows During Pregnancy, Parturition, Lactation and After Weaning. *J Endocrinol.* 64: 141-154.

Ayres, B. E.; Thomas, F.; Zacharowski, K.; Lightman, S. L.; Persad, R. A. 2007. The Stress Response in Laparoscopic Urological Surgery. *BJU Int.* 1331-1332.

Barb, C. R.; Kraeling, R. R.; Rampacek, G. B.; Fonda, E. S.; Kiser, T. E. 1982. Inhibition of ovulation and LH secretion in the gilt after treatment with ACTH or hydrocortisone. *J Reprod Fertil.* 65 : 85-92.

Bathgate, R.; Eriksson, B.; Maxwell, W .M. C.; Evans, G. 2005. Low dose deep intrauterine insemination of sows with fresh and frozen-thawed. *Theriogenology.* 63: 553–554.

Becker, B .A.; Nienaber, J. A.; Christenson, R. K.; Manak, R. C.; DeShazer, J. A.; Hahn, G. L. 1985. Peripheral concentrations of cortisol as an indicator of stress in the pig. *Am J Vet Res.* 19: 28-34.

Berghold, P.; Möstl, E.; Aurich, C. 2007. Effects of reproductive status and management on cortisol secretion and fertility of oestrous horse mares. *Anim Reprod Sci.* 102: 276–285.

Blackshaw, J.; K.; Blackshaw, A. W. 1989. Limitation of salivary and blood cortisol determination in pigs. *Vet Res Commun.* 13: 256-271.

Blokhuis, H. J.; Hopster, H.; Geversink, N. A.; Korte, S. M.; Van Reenen, C. G. 1998. Studies of stress in farm animals. *Comp Haem Int.* 8: 94-101.

Bottoms, G. D.; Roesel, O. F.; Rausch, F. D.; Akins, E. L. 1972. Circadian variation in plasma cortisol and corticosterone in pigs and mares. *Am J Vet Res.* 33: 785-790.

Brandt, Y. 2006. The effect of ACTH during oestrus on the reproduction in the sow: with special reference to duration of oestrus, ovulation, hormonal patterns, gametes and early embryo development. *PhD Thesis. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences.*

BIBLIOGRAFÍA

- Brien, T. G. 1980. Free cortisol in human plasma. *Horm. Metab. Res.* 12: 643-650.
- Broom, D. M; Johnson, K. G. 1993. Stress and Animal Welfare. London ; Melbourne : Chapman & Hall. 1st ed.
- Broom, D.M. 1996. Animal welfare defined in terms of attempts to cope with the environment. *Acta Agric. Scand. Sect. A, Anim. Sci. Suppl.* 27: 22-28.
- Burpee, S. E.; Kurian, M.; Murakame, Y.; Benevides, S.; Gagner, M. 2002. The metabolic immune and response to laparoscopic v.s open liver resection. *Surg Endosc.* 16:899-904.
- Bushong, D. M.; Friend, T. H.; Knabe, D. A. 2000. Salivary and plasma cortisol response to adrenocorticotropin administration in pigs. *Lab. Anim.* 34(2): 171-181.
- Buunen, M.; Gholghesaei, M.; Veldkamp, R.; Meijer, D. W.; Bonjer, H. J.; Bouvy, N. D. 2004. Stress response to laparoscopic surgery. *Surg Endosc.* 18 : 1022–8.
- Cannon, WB. 1929. Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. Appleton, New York, USA.
- Cannon, W. 1932. Wisdom of the Body. Norton.
- Cannon, W. 1935. Stress and strains of homeostasis. *Am. J. Med. Sci.* 189, 1–14.
- Carlsson, H.E.; Lyberg, K.; Royo, F.; Hau, J. 2007. Quantification of stress sensitive markers in single fecal samples do not accurately predict excretion of these in the pig. *Res Vet Sci.* 82: 423–428.
- Chiba, L. I. 2009. Pig nutrition and feeding. In 'Animal Nutrition Handbook'. (Ed. L. I. Chiba.) pp. 285–315.
- Citizendium. Online enciclopedia (<http://en.citizendium.org/>)
- Clarke, I. J.; Hemsworth, P. H.; Barnett, J. L.; Tilbrook, A. J. 1992. Stress and reproduction in farm animals. In: Sheppard KE.
- Clutton, R. E.; Bracken, J.; Ritchie, M. 1998. Effect of muscle injection site and drug temperature on pre-anaesthetic sedation in pigs. *Vet Rec.* 142(26):718-21.
- Colemana, G. J.; Hemsworthb, P. H.; Haya, M.; Coxb, M. 2010. Modifying stockperson attitudes and behaviour towards pigs at a large commercial farm. *Appl Anim Behav Sci.* 66: 11-20.

Cook, N. J.; Schaefer, A. L.; Lepage, P.; Jones, S. M. 1997. Radioimmunoassay for Cortisol in Pig Saliva and Serum. *J Agric Food Chem.*45: 395-399.

Cook, N.J.; Schaefer, A.L.; Lepage, P.; Jones, S. M. 1996. Salivary vs serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Can J Anim Sci.* 76: 329–335.

Cooper, T. R.; Trunckfield, H. R.; Zanella, A. J.; Booth, W. D. 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay for cortisol in the saliva of man and domestic farm animals. *J Endocrinol.* 123(2):R13-6.

Da Silva, J.A. 1995. Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses. *Ann Rheum Dis.* 54:6–16.

Daelemans, J. 1984. Confinement of sows related to their productivity. *Ann Rech Vet.* 15: 149–158.

Daley, C. A.; Sakurai, H.; Adams, B. M. and Adams, T. E. 1999. Effect of Stress-Like Concentrations of Cortisol on Gonadotroph Function in Orchidectomized Sheep. *Biol of Reprod* . 60: 158–163.

Dalin, A. M.; Mangnusson, U.; Haggendal, J.; Nyberg, L. 1993. The effect of thiopentone-sodium anesthesia and surgery, relocation grouping, and hydrocortisone treatment on the blod levels of cortisol, corticosteroid-binding globulin and catecholamines in pigs. *J Anim Sci.* 71, 1902-1909.

Dallman, M. F.; Akana, S. F.; Cascio, C. S.; Darlington, D. N.; Jacobs, L.; Levin, N. 1987. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog Horm Res.* 43: 113-167.

Darwin, C. 1859. On the origin of species by means of natural selection, 1st edition. John Murray, London. 375 pp.

Desbrought, J. P. 2000. The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth.* 1: 109-17.

Einarsson, S.; Brandt, Y.; Lundeheim, N.; Madej, A. 2008. Stress and its influence on reproduction in pigs: a review. *Acta Vet Scand.* 50: 48.

Einarsson, S.; Ljung, A.; Brandt, Y.; Hager, M.; Madej, A. 2007. Impact of Exogenous ACTH During Pro-Oestrus on Endocrine Profile and Oestrous Cycle Characteristics in Sows. *Reprod Dom Anim.* 42: 100–104.

El acceso a la legislación europea. (<http://eur-lex.europa.eu/>).

BIBLIOGRAFÍA

Elenkov, I. J.; Chrousos, F. P. 2002. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 966: 290-303.

Emack, J.; Kostaki, A.; Walker, C. D.; Matthews, S. G. 2008. Chronic maternal stress affects growth, behaviour and hypothalamo–pituitary–adrenal function in juvenile offspring. *Horm Behav.* 54: 514–520.

Eriksson, B. M.; Petersson, H.; Martinez, H. R. 2002. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology.* 58: 1065–1079.

Farmer, C.; Dubreuil, P.; Couture, Y.; Brazeau, P. and Petitclerc, D. 1991. Hormonal changes following an acute stress in control and somatostatin –immunized pigs. *Domest Anim Endocrinol.* 8(4):527-36.

Fauci, A. S. 1979. Immunosuppressive and Anti-inflammatory effects of glucocorticoids; in Baxter and Rousseau, *Monogr Endocrinol.* 12:449-65.

Fell, L. R.; Shutt, D.; Bentley, C. J. 1985. Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma 'free' cortisol arising from acute stress in sheep. *Australian Veterinary Journal.* 62: 403-6

Flezzani, P.; Croughwell, N. D.; McIntyre, R. W.; Reves, J. G. 1986. Isoflurane decreases the cortisol response to cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg.* 65(11):1117-22.

Fonda, E. S.; Rampecek, G. B.; Kraeling, R. R. 1984. The effect of adrenocorticotropin or hydrocortisone on serum luteinizing hormone concentrations after adrenalectomy and/or ovariectomy in the prepubertal gilt. *Endocrinology.* 114: 268-273.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (<http://faostat.fao.org/>).

Foot, R. H. 2002. The history of artificial insemination: selected notes and notables. Symposia supplement of *J Anim Sci.* ASAS 2001 Joint National Meeting (Vol 80 ESuppl. 2), Orlando, FL, USA.

Fraser, D. 1995. Science, values and animal welfare: exploring the 'inextricable connection'. *Anim Welf.* 4(2): 103-117.

Fraser, D. 2008. Understanding animal welfare. *Acta Vet Scand.* 50: 1-6.

Fuentes, M.; Tecles, F.; Gutierrez, A.; Otal, J.; Subiela, S. M.; Ceron, J. J. 2011. Validation of an automated method for salivary alpha-amylase measurements in pigs (*Sus scrofa domestica*) and its application as a stress biomarker. *J Vet Diagn Invest.* 23:282–287.

García, E. M.; Vázquez, J. M.; Parrilla, I.; Calvete, J. J.; Sanz, L.; Caballero, I.; Roca, J.; Vazquez, J. L.; Martínez, E. A. 2007. Improving the fertilizing ability of sex sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*. 68(5):771-8

Geverink, N. A.; Ruis, M. A.; Eisen, R.; Lambooj, E.; Blokhuis, H. J.; Wiegant, V. M. 1999. The effect of shot biopsy on behavior, salivary cortisol, and heart rate in slaughter pigs. *J Anim Sci*. 77(7):1614-9.

Gil, J.; Tortades, J.M.; Alevia, A. 2000. Post-cervical insemination, *Proceedings of the XVIth International Pig Veterinary Society Congress*. Melbourne. p. 399.

Goldstein, D. S. 1987. Stress induced activation of the sympathetic nervous system. In "Neuroendocrinology of stress" (Ed. A Grossman) pp.253-278. (Bailliere Tindall: London).

Goulding N.J. & Flower R.J. (Editors). "Glucocorticoids (Milestones in Drug Therapy)". Birkhauser. 2001. 1st Edition.

Gross, C. G. 2008. Three before their time: neuroscientists whose ideas were ignored by their contemporaries. *Exp Brain Res*. 192(3):321-34. 2008.

Guedes, R. M. C.; Nogueira, R. H. G. 2001. The influence of parity order and body condition and serum hormones on weaning-to-estrus interval of sows. *Anim Reprod Sci*. 67: 91–99.

Gutiérrez, A. M.; Martínez-Subiela, S.; Soler, L.; Pallarés, F. J.; Cerón, J. J. 2009. Use of saliva for haptoglobin and C-reactive protein quantifications in porcine respiratory and reproductive syndrome affected pigs in field conditions. *Vet Immunol Immunopathol*. 132(2-4):218-23.

Gutiérrez, A. M.; Martínez, S. S.; Cerón, J. J. 2011. Evaluation of changes in haptoglobin and C-reactive protein concentrations caused by freezing of saliva and meat juice samples collected from healthy and diseased pigs. *Am J Vet Res*. 72(1).

Hay, M.; Salaun, M. C. M.; Brulaud, F.; Monnier, M.; Mormède, P. 2000. Assessment of hypothalamic–pituitary–adrenal axis and sympathetic nervous system activity in pregnant sows through the measurement of glucocorticoids and catecholamines in urine. *J Anim Sci*. 78: 420–8.

Hemsworth, P. H.; Barnett, J. L.; Hansen, C. 1986a. The influence of handling by humans on the behaviour, reproduction and corticosteroids of male and female pigs. *Appl Anim Behav Sci*. 15:303–14.

Hemsworth, P. H.; Barnett, J. L.; Hansen, C.; Winfield, C. G. 1986b. Effect of social environment on welfare status and sexual behaviour of female pigs. II. Effects of space allowance. *Appl Anim Behav Sci.* 16:259– 67.

Hennessy, D. P.; Williamson, P. 1983. The effects of stress and of ACTH administration in hormone profiles, estrus and ovulation in pigs. *Theriogenology.* 20:13–26.

Henricks, D. M.; Guthrie, H. D.; Handlin, D. L. 1972. Plasma estrogen, progesterone and luteinizing hormone levels during the estrous cycle in pigs. *Biol Reprod.* 6(2):210-8.

Henry, J. P.; Stephens, P. M. 1977. The social environment and essential hypertension in mice: possible role of the innervation of the adrenal cortex. *Prog Brain Res.* 47:263-76.

Herskin, M. S.; Munksgaard, L.; Ladewig, J. 2004. Effects of acute stressors on nociception, adrenocortical responses and behavior of dairy cows. *Physiol Behav.* 83: 411 –420.

Hughes, B. O. 1976. Behaviour as an index of welfare. *Proc. V. Europ. Poultry Conference Malta,* pp. 1005-1018.

Hughes, P. E. 1982. Factors affecting the natural attainment of puberty in gilt. In “control of pig reproduction. (Eds DJA Cole and GR Foxcroft) pp. 117-138. (Butterworth: London).

Hulten, F.; Valros, A.; Rundgren, M.; Einarsson, S. 2002. Reproductive endocrinology and postweaning performance in the multiparous sow Pate 2. Influence of nursing behavior. *Theriogenology.* 58: 1519-1530.

Ingram, D. L.; Dauncey, M. J.; Barrand, M. A.; Callingham, B. A. 1980. Variations in plasma catecholamines in the young pig in response to extremes of ambient temperature compared with exercise and feeding. *Catecholamines and Stress: Rec Adv.* 273-278.

Janssens, C. J.; Helmond, F. A.; Wiegant, V. M. 1994. Increased cortisol response to exogenous adrenocorticotrophic hormone in chronically stressed pigs: influence of housing conditions. *J Anim Sci.* 72: 1771-1777.

Janssens, C. J.; Helmond, F. A.; Wiegant, V. M. 1995a. The effect of chronic stress on plasma cortisol concentrations in cyclic female pigs depends on the time of day. *Domest Anim Endocrinol.* 12(2):167-77.

Janssens, C. J.; Helmond, F. A.; Loyens, L. W. S.; Schouten, W. G. P.; Wiegant, V. M. 1995b. Chronic stress increases the opioid-mediated inhibition of the pituitary-adrenocortical response to acute stress in pigs. *Endocrinology.* 136: 1468-1473.

BIBLIOGRAFÍA

Jensen, K. H.; Hansen, S. W.; Pedersen, L. J. 1996. Intermittent stress in pigs: effects on behavior, pituitary-adrenocortical axis, growth, and gastric ulceration. *Physiol Behav.* 1996. 59(4-5):741-8.

Johnson, L. A.; Weitze, K. F.; Fiser, P. Maxwell, W. M.C. 2000. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 62: 143-172.

Joris, J.; Cigarini, I.; Legrand, M. 1992. Metabolic and respiratory changes after cholecystectomy performed via laparotomy or laparoscopy. *Br J Anaesth.* 69: 341-5.

Keeling, L.; Jensen, P. 2002. Behavioural Disturbances, Stress and Welfare. In: Jensen P (ed.): *The Ethology of Domestic Animals: an Introductory Text.* CAB International, UK.

Kineman, R. D.; Leshin, L. S.; Crim, J. W.; Rampacek, G. B.; Kraeling.; R. R. 1988. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the forebrain of the pig. *Biol Reprod.* 39: 665-672.

Kirschbaum, C.; Hellhammer, D. H. 1989. Salivary cortisol in psychobiological research: an overview. *Neuropsychobiology.* 22(3):150-69.

Koolhaas, J. M.; Korte, S. M.; De Boer, S. F.; Van Der Vegt, B. J.; Van Reenen, C. G.; Hopster, H.; De Jong, I. C.; Ruis, M. A.; Blokhuis, H. J. 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stressphysiology. *Neurosci Biobehav Rev.* 23, 925-35.

Kraeling, R. R.; Barb, C. R. 1990. Hypothalamic control of gonadotrophin and prolactin secretion in pigs. *J Reprod Fertil Suppl.* 40:3-17.

Kranendonk, G.; Hopster, H.; Fillerup, M.; Ekkel, E. D.; Mulder, E. J.H.; Wiegant, V. M.; Taverne Marcel, A.M. 2006. Lower birth weight and attenuated adrenocortical response to ACTH in offspring from sows that orally received cortisol during gestation. *Domest Anim Endocrinol.* 30: 218-238.

Kunavongkrit, A.; Madej, A.; Einarsson, S. 1984. Plasma Levels of Cortisol in Zero-Weaned and Lacting Sows During the First Two Weeks Post Partum. *Domest Anim Endocrinol.* 1(3):217-223.

Lang, A.; Kaeoket, K.; Kindahl, H.; Madej, A.; Einarsson, E. 2004. Influence of CRH and ACTH Administration on Endocrine Profile and Ovulation in Sows. *Reprod Dom Anim.* 39: 181-189.

Lay, D. C.; Kattesh, J. H. G.; Cunnick, J. E.; Daniels, M. J.; McMunn, K. A.; Toscano, M. J.; Roberts, M. P. 2008. Prenatal stress effects on pig development and response to weaning. *J Anim Sci.* 86:1316-1324.

Leslie, E.; Hernández-Jover, M.; Newman, N.; Holyoake, P. 2010. Assessment of acute pain experienced by piglets from ear tagging, ear notching and intraperitoneal injectable transponders. *Appl Anim Behav Sci.* 127: 86–95

Lewis, J. G. 2006. Steroid Analysis in Saliva: An overview. *Clin Biochem Rev.* 27: 139.

Li, P. S. 1987. The effects of cortisol or adrenocorticotrophic hormone and luteinizing hormone secretion by pig pituitary cells in vitro. *Biol Reprod.* 36: 119, Abstr.

Liptrap, R. M. 1973. Oestrogen excretion by sows with induced cystic ovarian follicles. *Res vet Sci.* 15: 215-219.

Lyimo, Z. C.; Nielen, M.; Ouweltjes, W.; Kruij, T. A.; van Eerdenburg, F. J. 2000. Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology.* 53(9):1783-95.

Macalay, A. S.; Roussel, J. D.; Seybt, S. H. 1986. Cortisol response in heifers to artificial insemination, natural mating, and no mating at estrus. *Theriogenology.* 26(1):117-23.

Madej, A.; Madsen, M. T.; Brandt, Y.; Kindahl, H.; Einarsson, S. 2005. Stress related effects on reproductive capacity of pigs. *J Anim Feed Sci.* 14: 205–212.

Manteuffel, G. 2002. Central nervous regulation of the hypothalamic–pituitary– adrenal axis and its impact on fertility, immunity, metabolism and animal welfare, a review. *Arch Tierz.* 45:575–95.

Ruis, M. A. W.; TE Brake, J. H. A.; Engel, B.; Ekkel, E.; Buist, W. G.; Blokhuis, H. J.; Koolhaas, J. M. 1997. The Circadian Rhythm of Salivary Cortisol in Growing Pigs: Effects of Age, Gender, and Stress. *Physiol Behav.* 62 (3)623–630.

Martin, C. R. 1985. *“Endocrine Physiology”*. Oxford University Press.

Martinez, E. A.; Vazquez, J. M.; Roca, J.; Lucas, X.; Gil, M. A.; Parrilla, I.; Vazquez, J. L.; Day, B. N. 2002 .Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction.* 123(1):163-70.

Martinez, E. A.; Vazquez, J. M.; Roca, J.; Cuello, C.; Gil, M. A.; Parrilla, I.; Vazquez, J. L. 2005. An update on reproductive technologies with potential short-term application in pig production. *Reprod Domest Anim.* 40: 300–9.

Martinez, E. A.; Vazquez, J. M.; Roca, J.; Lucas, X.; Gil, M. A.; Vazquez, J. L. 2001. Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *Reproduction.* 58(Suppl), 301–311.

BIBLIOGRAFÍA

McGuire, J. L.; Brookes, P. H.; McConnell, R. F.; Hahn, D. W.; DaVanzo, J. P.; Solomon, S. A.; Turner, G. D. 1975. Ovarian and adrenal function during the estrous cycle of the sow. *Theriogenology*. 3(1):1-13.

McCann, S. M; Antunes-Rodrigues, J; Franci, C. R; Anselmo-Franci, J. A; Karanth, S.; Rettori, V. 2000. Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. *Braz J Med Biol Res*. 33(10):1121-31.

Michel, L. M. 2007. Historical approach and evolution of the stress concept: A personal account. *Psychoneuroendocrinology*. 0306-4530.

Minton, J . E. 1994. Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals. *J Anim Sci*. 72: 1891-8.

Miyake, H.; Kawabata, G.; Gotoh, A.; Fujisawa, M.; Okada, H.; Arakawa, S.; Kamidono, S.; Hara, I . 2002. Comparison of surgical stress between laparoscopy and open surgery in the field of urology by the measurement of humoral mediators. *Int J Urol*. 9 : 329–33.

Moberg, G, P. 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg GP and Mench JA (eds) *The Biology of Animal Stress* pp 1-21. CABI Publishing: Oxon, UK.

Moberg, G. P. 1985. Influence of stress on reproduction: measure of well-being. In: Moberg GP, editor. *Animal stress*. Baltimore: *Williams & Wilkins*. p. 245–67.

Moberg GP. 1987. Influence of the adrenal axis upon the gonads. *Oxf Rev Reprod Biol*. 9:456-96.

Mormède, P. 1995. Le stress: interaction animal-homme-environnement. *Cah Agric*. 4:275–86.

Mormède, P.; Andanson, S.; Aupérin, B.; Beerda, B.; Guémené, D.; Malmkvist, J.; Manteca, X.; Manteuffel, G.; Prunet, P.; van Reenen, C. G.; Richard, S.; Veissier, V. 2007. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav*. 92: 317–339.

Mostl, E.; Palme, R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol*. 23: 67–74.

Munck, A.; Guyre, P.; Holbrook, N. 1984. Physiological functions of glucocorticoids during stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev*. 5: 25-44.

Murani, M.; Ponsuksili, S.; D'Eath, R. D.; Turner, S. P.; Kurt, S.; Evans, G.; Thölking, L.; Klont, L.; Foury, A.; Mormède, P.; Wimmers, K. 2010. Association of HPA axis-related genetic variation with stress reactivity and aggressive behaviour in pigs. *BMC Genetics*. 11:7

Naitoh, T.; Garcia Ruiz, A.; Valdisavljevic, A.; Matsuno, S.; Gagner, M. 2002. Gastrointestinal transit and stress response after laparoscopic v.s conventional distal pancreatectomy in the canine model. *Surg Endosc*. 16: 1627-1630.

Negrao, J. A.; Porcionato, M. A., de Passille, A. M.; Rushen, J. 2004. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. *J Dairy Sci*. 87: 1713-1718.

Neubert, E.; Gürtler, H.; Vallentin, G. 1996. Effect of restraining growth pigs with snare restraints on plasma levels of catecholamines, cortisol, insulin and metabolic parameters. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* . 109(11-12):409-13.

Newton, E. A.; Stevenson, J. S.; Minton, J. E.; Davis, D. L. 1987 .Endocrine changes before and after weaning in response to boar exposure and altered suckling in sows. *J Reprod Fertil*. 81(2):599-609.

Nguyen, N. T.; Goldman, C. D.; Ho, H. S.; Gosselin, R. C.; Singh, A.; Wolfe, B. M. 2002. Systemic Stress Response after Laparoscopic and Open Gastric Bypass. *J Am Coll Surg*. 194:55.-66

Norrby, M.; Madsen, M. T.; Alexandersen, C. B.; Kindahl, H.; Madej, A. 2007. Plasma concentrations of cortisol and PGF₂ α metabolite in Danish sows during mating, and intrauterine and conventional insemination. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 49:36.

Norrby, M.; Madsen, M. T.; Saravia, F.; Lundeheim, N.; Madej, A. 2011. Genistein Alters the Release of Oxytocin, Prostaglandins, Cortisol and LH during Insemination in Gilts. *Reprod Dom Anim*. 46, 316–324.

Nyberg, L.; Lundstrom, K.; Edfors-Lilja, I.; Rundren, M. 1988. Effects of transport stress on concentrations of cortisol, corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid receptors in pigs with different halothane genotypes. *J. Anim. Sci*. 66: 1201-1211.

Palme, R.; Moestl, E. 1997. Measurement of cortisol metabolites in feces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *Mamm Biol*. 62(2): 192-197.

Parrott, R. F.; Misson, B. H.; Baldwin, B. A. 1989. Salivary cortisol in pigs following adrenocorticotrophic hormone stimulation: comparison with plasma levels. *Br Vet J*. 145: 362-366.

Parrott, R. F.; Lloyd, D. M. 1995. Restraint, but not frustration, induces prostaglandin-mediated hyperthermia in pigs. *Physiol Behav.* 57: 1051-1055.

Pearce, G. P.; Paterson, A. M.; Hughes, P. E. 1988. Effect of short-term elevations in plasma cortisol concentration on LH secretion in prepubertal gilts. *J Reprod Fert.* 83: 134-418.

Peeters, M.; Sulon, J.; Bckers, J. F.; Ledoux, D.; M. Vandenheede. 2010. Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine vet J.* 43: 487-493.

Porter, V. 1993. Pigs: A Handbook to the Breeds of the World. *Cornell University Press*, Ithaca, NY.

Prunier, A.; Mounier, A. M.; Hay, M. 2005. Effects of castration, tooth resection, or tail docking on plasma metabolites and stress hormones in young pigs. *J Anim Sci.* 83: 216-222.

Razdan, P.; Mwanza, M. A.; Kindahl, H.; Rodriguez-Martinez, H.; Hultén, F.; Einarsson, S. 2002. Effect of repeated ACTH-stimulation on early embryonic development and hormonal profiles in sows. *Anim Reprod Sci.* 70: 127–137

Restituto, P.; Galofré, J. C.; Gil, M. J.; Mugueta, C.; Santos, S.; Monreal, J. I.; Varo, N. 2008. Advantage of salivary cortisol measurements in the diagnosis of glucocorticoid related disorders. *Clinical Biochemistry.* 41: 688–692.

Riad-Fahmy, D. D.; Read, G. F.; Walker, R. F.; Griffiths, K. 1982. Steroids in saliva for assessing endocrine status. *Endocr Rev.* 3: 367-395.

Roberts, P. K.; Bilkei, G. 2005. Field experiences on post-cervical artificial insemination in the sows. *Reprod Domest Anim.* 40: 489–491.

Roca, J.; Vazquez, J. M.; Gil, M. A.; Cuello, C.; Parrilla, I.; Martinez, E. A. 2006. Challenges in Pig Artificial Insemination. *Reprod Domest Anim.* 41: 43–53.

Roca, J.; Parrilla, I.; Rodriguez-Martinez, H.; Gil, M.A.; Cuello, C.; Vazquez, J.M.; Martinez, E.A. 2011. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. *Reprod Domest Anim.* En prensa.

Rojkittikhun, T.; Rojanasthien, S.; Einarsson, S.; Madej, A.; Lundeheim, N. 1991. Effect of fractionated weaning on hormonal patterns and weaning to oestrus interval in primiparous sows. *Acta Vet Scand.* 32(1):35-45.

Ruis, M. A.; Te brake, J. H. A.; Engel, B.; Ekkel, E. D.; Buist, W. G.; Blokhuis, H. J.; Koolhaas, J. M. 1997. The Circadian Rhythm of Salivary Cortisol in Growing Pigs: Effects of Age, Gender, and Stress. *Physiol Behav.* 62 (3): 623–30.

Sapolsky, R. M. 1992. Neuroendocrinology of the stress response. In Becker, JB et al. (Eds): Behavioral Endocrinology. *Massachusetts Institute of Technology Press, USA*, 287–324.

Sapolsky, R. M.; Romero, L. M.; Munck, A. U. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 21(1): 55-89.

Scherer, K. R. 2001. Appraisal considered as a process of multi-level sequential checking. *Oxford University Press, New York, USA*, 92–120.

Selye, H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 138: 32.

Selye, H. 1976. Stress Without Distress. *Brux Med.* 56(5):205-10.

Singer, P. 1975. Animal Liberation. 2nd edition (1st edition 1975). *AvonBooks.* New York.

Soede, N. M.; Helmond, F. A.; Schouten, W. P.; Kemp, B. 1997. Oestrus, ovulation and periovulatory hormone profiles in tethered and loose-housed sows. *Anim Reprod Sci.* 46:133–48.

Soede, N. M.; Roelofs, J. B.; Verheijen, R. J.; Schouten, W. P.; Hazeleger, W.; Kemp, B. 2007. Effect of repeated stress treatments during the follicular phase and early pregnancy on reproductive performance of gilts. *Reprod Domest Anim.* 42(2):135-42.

Squires, E. J. 2003. Applied Animal Endocrinology. *CAB International.* UK. 192-229.

Stanchev, P.; Rodriguez-Martinez, H.; Edqvist, L. E.; Eriksson, H. 1985. Oestradiol and progesterone receptors in the pig oviduct during the oestrous cycle. *J Steroid Biochem.* 22(1):115-20.

Steverink, D. W.; Soede, N. M.; Bouwman, E. G.; Kemp, B. 1998. Semen backflow after insemination and its effect on fertilization results in sows. *Anim Reprod Sci.* 54: 109–119.

Sylvester, S. P.; Mellor, D. J.; Stafford, K. J.; Bruce, R. A.; Ward, R. N. 1998. Acute cortisol responses of calves to scoop dehorning using local anaesthesia and/or cautery of the wound. *Aust Vet J.* 76(2):118-22.

Szabo, S. 1985. Understanding Biologic stress for study design and interpretation of results. *Dis Sci*. 30:285-315.

Tarín, J. J.; Hamatani, T.; Cano, A. 2010. Acute stress may induce ovulation in women. *Reprod Biol Endocrinol*. 8:53.

Taylor, G. B. 1972. One man's philosophy of welfare. *Vet Rec*. 91(18): 426-428.

Terlouw, E. M. C.; Schouten, W. G. P.; Ladewig, J. 1997. Physiology. In: Appleby, M.C., Hughes, B.O. (Eds.), *Animal Welfare*. CABI, Oxon, UK, pp. 383 – 390.

Terlouw, C. 2005. Stress reactions at slaughter and meat quality in pigs: genetic background and prior experience: A brief review of recent findings. *Livest Prod Sci*. 94: 125-135.

Tilbrook, A. J.; Turner, A. I.; Clarke, I. J. 2002. Stress and reproduction: central mechanisms and sex differences in nonrodent species. *Stress*. 5:83–100.

Torpy, D. J.; Chrousos, G. P. 1996. The three-way interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal and gonadal axes and the immune system. *Baillieres Clin Rheumatol*. 10: 181-198.

Tsuma, V. T.; Einarsson, S.; Madej, A.; Lundeheim, N. 1995. Hormone profiles around weaning in cyclic and anoestrous sows. *Zentralbl Veterinarmed A* . 42(2):153-163.

Turner, A. I.; Hemsworth, P. H.; Hughes, P. E.; Canny, B. J.; Tilbrook, A. J. 1998. The effect of repeated boar exposure on cortisol secretion and reproduction in gilts. *Anim Reprod Sci*. 51: 143–154.

Turner, A. I.; Hemsworth, P. H.; Canny, B. J.; Tilbrook, A. J. 1999a. Sustained but not repeated acute elevation of cortisol impaired the luteinizing hormone surge, estrus, and ovulation in gilts. *Biol Reprod*. 61(3):614-20.

Turner, A. I.; Hemsworth, P. H.; Canny, B. J.; Tilbrook, A. J. 1999b. Inhibition of the secretion of LH in ovariectomised pigs by sustained but not repeated acute elevation of cortisol in the absence but not the presence of oestradiol. *J Endocrinol*. 163: 477–486.

Turner, A. I.; Hemsworth, P. H.; Tilbrook, A. J. 2002. Susceptibility of reproduction in female pigs to impairment by stress and the role of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Reprod Fertil Dev*. 14:377–91.

BIBLIOGRAFÍA

Turner, A. I.; Hemsworth, P. H.; Tilbrook, A. J. 2005. Susceptibility of reproduction in female pigs to impairment by stress or elevation of cortisol. *Domest Anim Endocrinol.* 29: 398–410.

Undelsman, R; Holdbrook, N. J. 1984. Endocrine and molecular responses to surgical stress, *Curr Probl Surg.* 31: 653-720.

Van Praag, H. M.; De Kloet, R.; Van OS, J. 2004. Stress, the brain and depression. Cambridge University press, Cambridge. U. K.

Varley, M. A.; Stedman, R. 1994. Stress and reproduction. In: Cole DJ, Wiseman J, Varley MA, editors. Principles in pig science. Leicestershire: *Loughborough.* 277–96.

Vazquez, J. M.; Roca, J.; Gil, M. A.; Cuello, C.; Parrilla, I.; Vazquez, J. L.; Martinez, E. A. 2008. New developments in low-dose insemination technology. *Theriogenology.* 70: 1216–1224.

Vazquez, J. M.; Martinez, E. A.; Parrilla, I.; Cuello, C.; Gil M. A.; Garcia, E.; Caballero, I.; Alminana, C.; Bolarin, A.; Roca, J.; Vazquez, J. L. 2006. Laparoscopic intraoviductal insemination in pigs: a new tool for improving the efficiency of sex sorted spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 41, 298 (abstract).

Veissier, I.; A. Boissy, A. 2006. Stress and welfare: Two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view. *Physiol Behav.* 92(3): 429-433

Velarde, A. y Dalmau, A. 2010. Evaluación del bienestar: Protocolo Welfare Quality®. IRTA. España.

Viner, R. 1999. Putting Stress in Life: Hans Selye and the Making of Stress Theory. *Social Studies of Science.* 29: 391-410.

Von Borell, E.; Ladewig, J. 1989. Altered Adrenocortical Response to Acute Stressors or ACTH(1-24) in Intensively Housed Pigs. *Domest Anim Endocrinol.* 6(4):299-309.

Von Borell E. H. 2001. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. *J Anim Sci.* 79:E260-E267.

Von Borell, E.; Dobson, H.; Prunier, A. 2007. Stress, behaviour and reproductive performance in female cattle and pigs. *Horm Behav.* 52(1):130-8.

BIBLIOGRAFÍA

Walker, R. F.; Riad-Fahmy, D.; Read, G. F. 1978. Adrenal status assessed by direct radioimmunoassay of cortisol in whole saliva or parotid saliva. *Clin Chem.* 24: 1460-3.

Watson, P. F.; Behan, J. R. 2002. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology.* 57: 1683–1693.

Weitze, K. F. 2000. Update on the worldwide application of swine AI. In: Johnson, L.A; Guthrie, H.D. (eds), Boar Semen Preservation IV. Allen Press, Lawrence, KS, pp. 141–146.

Wenger-Riggenbach, B.; Boretti, F. S.; Quante, S.; Schellenberg, S.; Reusch, C. E.; Sieber-Ruckstuhl, N. S. 2010. Salivary Cortisol Concentrations in Healthy Dogs and Dogs with Hypercortisolism. *J Vet Intern Med.* 24:551–556.

Weston, E. I. 2009. Evaluation of Cortisol in Saliva Relative to Serum in Lactating Cows, Heifer Calves and Piglets in Response to Applied Stress. *Master of Science.* North Carolina State University. USA

Wiepkema, P. R. 1990. Stress: ethological implications. In Puglisi-Allegra S, Oliverio A (Eds.): *Psychobiology of Stress. Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop Held in Sorrento, Italy, August 28 - September 2, 1988, 1-14.*

Wise, T.; Klindt, J.; Howard, H. J.; Conley, A.; Ford, J. J. 2001. Endocrine relationships of Meishan and White composite females after weaning and during the luteal phase of the estrous cycle. *J Anim Sci.* 79:176–187.

Woelders, H.; Matthijs, A. 2001. Phagocytosis of boar spermatozoa *in vitro* and *in vivo*. *Reprod Suppl.* 58: 113–127.

Yates, D. T.; Ross, T. T.; Hallford, D. M.; Yates, L. J.; Wesley, R. L. 2010. Technical note: Comparison of salivary and serum cortisol concentrations after adrenocorticotropic hormone challenge in ewes. *J Anim Sci.* 88:599–603.

Zeleznic, A. J.; Hillier, S. G. 1996. The ovary: Endocrine function. In “Scientific essential of reproductive medicine” (Eds SG Hillier, HC Kitchner and JP Nelson) pp. 134-146 (Snundres London).

Zhou, J.; Yan, X.; Ryan, D. H.; Harris, R. B. 1999. Sustained effects of repeated restraint stress on muscle and adipocyte metabolism in high-fat-fed rats. *Am J Physiol.* 1999. 277:R757-66.

UAB



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



UNIVERSIDAD DE MURCIA

IRTA

 **INIA**
Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria

IVIA
INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

 **agroalimed**
FUNDACIÓN DE LA COMUNIDAD
PARA LA INVESTIGACIÓN AGRARIA