

Avances en el área de la reproducción porcina

CARLOS GARCÍA ARTIGA. ⁽¹⁾

PABLO CONDE. ⁽²⁾

MIGUEL ANGEL HIGUERA. ⁽²⁾

BELÉN LLEO CASANOVA. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ UNIDAD DOCENTE DE ZOOLOGÍA. DPTO. DE FISIOLÓGIA ANIMAL. FACULTAD DE VETERINARIA. UCM.

⁽²⁾ KUBUS S.A.

Según los datos publicados por el MAPA en 2002, actualmente, España ocupa el segundo lugar en cuanto a efectivos porcinos de la UE con un total de 22.418.000 cabezas, representando del 18,04% de la UE, siendo el primer país Alemania. En relación a la producción de carne de porcino, España representa el 16,08% del total de la UE.

Las explotaciones de ganado porcino han experimentado una gran evolución en los últimos años, dando lugar a cambios profundos en los distintos parámetros que intervienen en el proceso de producción. En nuestra opinión, estos cambios se centran en tres puntos:

- Productividad, optimizar las condiciones y eficiencia de la producción y mejora del producto final.
- Sanidad, mediante la limitación de capacidades en las explotaciones y medidas de aislamiento de las mismas, disminuir la incidencia de enfermedades en las explotaciones porcinas, reduciendo los graves efectos económicos que se derivan de las mismas.
- Medio-ambiente, preservar los recursos naturales previniendo los posibles efectos negativos que pueda generar la ganadería intensiva.

En el sector porcino, se hace evidente el desarrollo e incorporación de nuevas tecnologías que inciden tanto en la productividad como en la sanidad animal. Estas técnicas se aplican en el área de la reproducción denominándose, Tecnologías de Reproducción Asistida (TRA).

A la hora de enumerar o describir estas técnicas debemos tener en cuenta la naturaleza del material biológico empleado (espermatozoides u ovocitos). Por lo tanto, podemos considerar tres puntos centrales: la congelación de semen, sexaje de espermatozoides y la transferencia de embriones.

Congelación de semen

Esta técnica permite:

1. Rentabilizar los reproductores de gran valor genético.
2. Establecimiento de bancos de semen que aseguren la actividad normal de una granja cuando existan situaciones de prohibición de movimiento de animales y semen.

Hoy en día, la utilización de semen congelado se limita a programas de mejora genética.

Sexaje de espermatozoides

Es indiscutible el interés que genera para la producción animal, el poder determinar el sexo de la progenie. Actualmente, el único método efectivo que ha podido repetirse en diferentes laboratorios y con un alto porcentaje de pureza en la separación ha sido la citometría de flujo. Esta técnica se basa en las diferencias existentes en la cantidad total de ADN entre los espermatozoide X e Y, (Martínez E., et al., 1999).

Para poder aplicar estas técnicas se necesita la ayuda de otras complementarias. Nos estamos refiriendo a la técnica de aplicación de las dosis seminales, inseminación artificial (IA). Al método tradicional de inseminación (3.000×10^6 de espermatozoides/dosis) se han sumado dos nuevas técnicas que permiten depositar el semen cerca del lugar de la fecundación; la inseminación postcervical (1.000 ó 500×10^6 de espermatozoides/dosis) y la inseminación intrauterina profunda (150×10^6 de espermatozoides/dosis). La presencia de estas nuevas técnicas suponen para la producción porcina una forma de optimizar la productividad de los verracos destinados a la IA.

Transferencia de embriones (TE)

La transferencia de embriones en el ganado porcino es una técnica donde se van obteniendo resultados aceptables tanto en supervivencia embrionaria como en gestación. Su aplicación tanto comercial como en programas de mejora genética es aún limitada. El desarrollo de la TE es fundamental para la aplicación de nuevas tecnologías.

Uno de los problemas que nos encontramos en la congelación de embriones porcinos es la baja viabilidad de los mismos una vez sometidos a dicho proceso. La principal causa la encon-



Recogida de embriones.

La tecnología genética ahora y en el futuro.



BioHypor

El primer sistema comercial de autorreposición
para la producción porcina.



**Entrada
nula de
animales**



**Mejora
genética
constante**

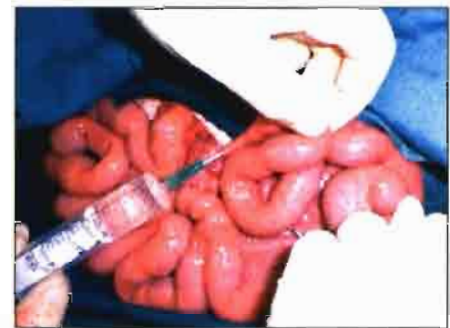
**Monitorización
a la
medida**

una compañía **nutreco**

Técnica quirúrgica de recuperación de embriones



Laparotomía por línea media



Exteriorización del aparato genital y fijación de cánulas

tramos en que los embriones de porcino son extremadamente sensibles al descenso térmico. La vitrificación representa una alternativa para minimizar los daños asociados al proceso de congelación (descenso térmico y la formación de cristales de hielo). El desarrollo de esta técnica puede favorecer entre otros puntos:

- Aumento de la producción de animales de alta calidad genética, implicando una mejora de la población porcina.
- Desarrollo de programas de cruzamiento entre variedades y líneas puras orientado a la producción de hembras híbridas destinadas a explotaciones de multiplicación, aprovechando el vigor híbrido de la heterosis.
- Alternativa para la conservación de razas autóctonas.
- Creación de unidades de conservación de embriones como defensa ante posibles agresiones sanitarias.

Con la realización de este artículo queremos mostrar las actividades que venimos desarrollando tanto en la obtención de embriones como en la vitrificación de los mismos. En primer lugar, describiremos los protocolos que hemos utilizado en la sincronización de animales y técnica utilizada para la recuperación de embriones. En segundo lugar, explicaremos la técnica de vitrificación y resultados que hemos obtenido hasta el momento.

Sincronización y superovulación

Hemos trabajado con cerdas de raza Duroc (102 animales) y 20 animales del cruce Large White (LW) x Landrace (LD). La principal característica de la raza Duroc es su rusticidad. Por lo tanto, una característica marcada es su baja prolificidad, en comparación con las razas o cruces utilizados convencionalmente en la producción porcina.

En relación al primer apartado, sincronización y superovulación. El objetivo que nos marcamos fue determinar el efecto

que ejercen las gonadotropinas exógenas sobre la actividad ovárica en cerdas de raza Duroc.

De los 102 animales utilizados en la experiencia, tuvimos que desechar un total de 22 cerdas que constituyen un 22% por diversos problemas (poliquística, endometritis). De las 20 hembras LW x LD, 4 no respondieron al tratamiento lo que representa un 20% del total.

De aquí, podemos sacar una primera conclusión: en la planificación de programas para obtener embriones podemos esperar un 20% de animales que no respondan al tratamiento por diversos motivos.

El tratamiento de sincronización y superovulación para todos los animales fue:

- Altrenogest: Durante 18 días.
- PMSG 1250 UI: A las 24 horas fin del altrenogest.
- hCG 750 UI: 83-96 horas de la PMSG.

En hembras de raza Duroc se compararon cuatro grupos de animales:

	Cuerpos lúteos	Quistes
Cerdas nulíparas en celo natural	11,9	0,4
Cerdas nulíparas tratadas	19,6	1,5
(PMSG 1.250 U.I. hcg 750)		
Cerdas múltiparas en celo natural.....	12,5	0,57
Cerdas múltiparas	20,5	0,85
(PMSG 1.250 U.I. hcg 750)		

Los resultados mostraron que al aplicar un protocolo de superovulación se aumentó la respuesta de cuerpos lúteos (CL) en las cerdas tratadas en comparación a las de celo natural, (Higuera Miguel, et al., 2002).

El porcentaje de embriones recuperados en cerdas de raza Duroc y que pueden ser procesados por tener un desarrollo óptimo fue:

LA EVOLUCIÓN DE UN CLÁSICO



**TECNICAS
IBERICAS**®

DE ALIMENTACIÓN ANIMAL

Soluciones de hoy, ventajas de mañana

Evoluciona un clásico en alimentación animal. Una sólida experiencia es nuestro secreto para buscar hoy soluciones de calidad que garanticen su tranquilidad de mañana. Le ofrecemos los mejores productos, un asesoramiento técnico eficaz y personalizado, porque estamos a su lado y conocemos sus necesidades.

Suplemento porcino

Porcentaje de embriones

Cerdas nulíparas en celo natural.....	75,69
Cerdas nulíparas tratadas.....	95,45
(PMSG 1.250 U.I. hcg 750)	
Cerdas múltiparas en celo natural.....	64,12
Cerdas múltiparas.....	78,4
(PMSG 1.250 U.I. hcg 750)	

Estos porcentajes indican que la sincronización acorta el periodo de ovocitación haciendo más rentable la técnica de vitrificación al obtener un mayor número de embriones en el estadio de desarrollo que se requiere para ser procesados (Higuera Miguel, et al., 2002).

En las cerdas blancas, de los 20 animales incluidos en la experiencia sólo se pudieron utilizar 16, lo que representa un 80% de respuesta al tratamiento. El total de embriones recuperados en el presente trabajo fueron:

Total de embriones

Cerdas duroc. 80 animales.....	1.021
Cerdas múltiparas cruce (LW-LD). 16 animales.....	310

Por lo tanto, se pudo comprobar como se mantiene la tendencia en cuanto a la prolificidad, aún realizando protocolos de sincronización y superovulación, comparando la raza "blanca" con la raza Duroc:

Número de embriones/cerda

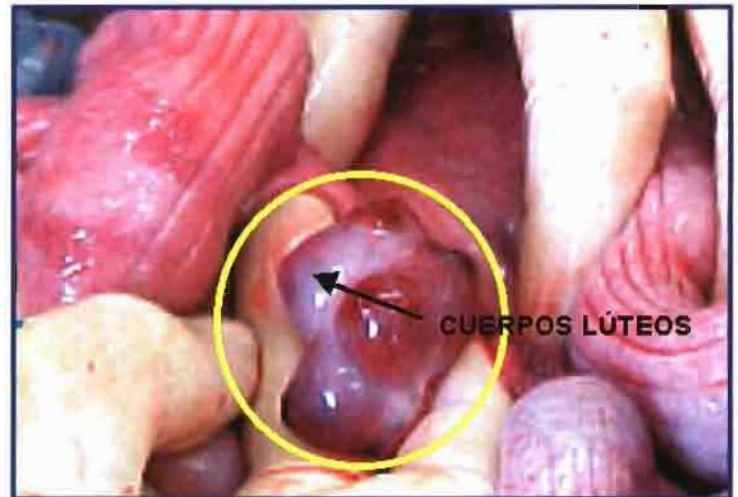
Cruce (LW-LD).....	19,38
Duroc.....	12,76

Para finalizar este apartado diremos que hemos trabajado en la determinación del momento ovocitación por ecografía. De esta manera, se pueden reducir notablemente los costes de obtención de embriones al poder determinar aquellas cerdas que no responden al tratamiento, evitando la intervención quirúrgica.

La recogida de los embriones se realiza básicamente siguiendo la técnica descrita por Martín Rillo et al. en 1985, habiéndose realizado algunas modificaciones. Normalmente se realiza la intervención el 5º día después de la IA.

Las fases que comprende esta técnica las podemos resumir en (**ver fotos pag. 22**):

1. Anestesia: 4 mg tiletamina + 0,02 mg etomidina + 0,04 mg atropina/kg de peso vivo. Se aplica por vía intramuscular e intravenosa. Otra alternativa a esta anestesia es la utilización de ketamina/xilacina que reduce notablemente los costes de la operación.
2. Limpieza y desinfección de la zona quirúrgica.
3. Laparotomía media ventral entre los dos pares caudales de mamas.
4. Incisión en la línea alba.
5. Localización y exteriorización de útero, ovarios y determina-



Recuento de cuerpos lúteos.

6. Colocación de clamps a unos 30 cm de la unión utero-tubárica. Incisión roma en el cuerno uterino e inserción de una cánula que facilita la salida de líquido que se recoge en tubos falcon. Fijación de una guía en el oviducto para introducir unos 30 ml la solución de lavado estéril a 37 °C, (PBS, buffer fosfatada alcalina).
7. Se realiza un magreado desde el oviducto hacia la posición donde se encuentra fijada la cánula, con el fin de que los embriones que puedan encontrarse en el oviducto y cerca de la unión utero-tubárica sean desplazados.
8. Los embriones recogidos en el líquido de lavado se introducen en una estufa a 37 °C.
Se repite la operación en el otro cuerno uterino.

Vitrificación de embriones

En relación al segundo apartado correspondiente a la vitrificación de embriones, comenzaremos explicando dicha técnica siguiendo el protocolo descrito por Dobrinsky (**ver fotos**).

El proceso de vitrificación

Se lleva a cabo mediante la incubación de los embriones en medios que contienen distintas concentraciones de BSA y de glicerol, con 1,5 µl de citocalasina-b, en una placa de cultivo de 4 pocillos. Todo el proceso se realiza a una temperatura de 25 °C:

Medio Berrt: En el centro de la placa de cultivo, los embriones son lavados tres veces. Incubar durante 5 minutos.

Medio Bevm (6% de BSA): lavar tres veces. Incubar durante 5 minutos.

ESTADIOS EMBRIONARIOS



DEGENERADO



4 BLASTÓMEROS

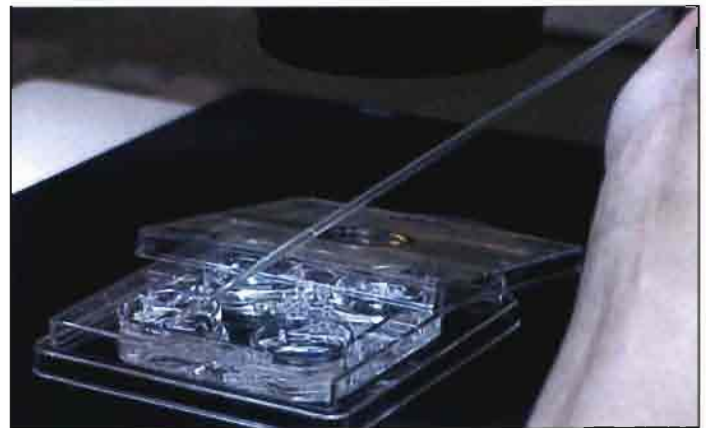
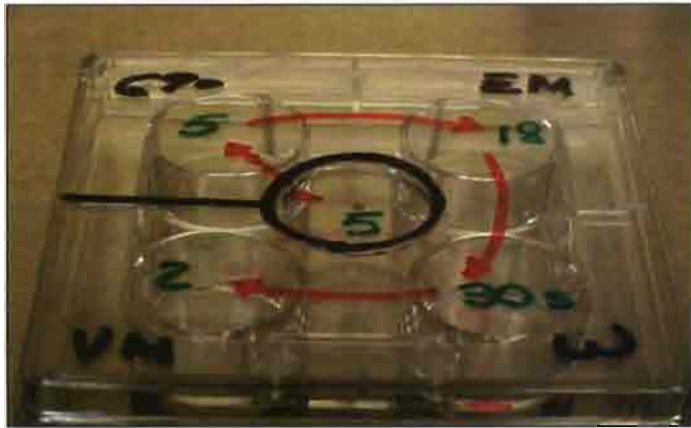


MÓRULA



BLASTOCISTO

Técnica de vitrificación de embriones



Medio ES3a después del lavado los embriones. Incubar durante 18 minutos.

Medio de lavado: 50% ES3a y 50% de medio de vitrificación. Lavar tres veces.

Medio de vitrificación: incubar durante 2 minutos.

Envasado en pajuelas

Las pajuelas se rellenan mediante succión del medio de vitrificación con una jeringa de insulina, aproximadamente 1 cm de medio, seguido de una burbuja de aire, y a continuación medio de vitrificación donde son introducidos los embriones. Las pajuelas son selladas en ambos extremos por calor. Se sumerge la pajuela en el nitrógeno líquido.

Descongelación

- La descongelación se realiza a 25 °C, mediante la inmersión de la pajuela en un baño de agua durante 10 segundos. Se cortan ambos extremos de la pajuela y con la ayuda de una varilla de plástico se deposita el medio en una placa de Petri.
- Los embriones se trasladan a una placa conteniendo sucrosa a 37 °C y se incuban durante 3 minutos.
- La rehidratación de los embriones se lleva a cabo mediante el lavado en los pocillos de la placa de rehidratación a 25 °C que contiene:

Deshidratación (Sucrosa 1M): Incubar durante 4 min.

Rehidratación 1 (Berrt 1): Lavar tres veces.

Rehidratación 2 (Berrt 2): Lavar e incubar durante 10 min.

Rehidratación 3 (Berrt 3): Lavar e incubar durante 10 min.

En relación al segundo apartado vitrificación de embriones, queremos destacar que sólo se pueden utilizar un 54,55% en relación al total de embriones obtenidos en la raza Duroc, (1021 embriones recogidos - 557 embriones vitrificados), (Conde P. et al., 2002). En el caso de embriones recuperados y posteriormente vitrificados del cruce (LW-LD) los resultados son muy semejantes con un rendimiento final del 53,23% (310 embriones recogidos - 165 embriones vitrificados). Esta pérdida se justifica en parte por la técnica empleada donde sólo se pueden vitrificar embriones que hayan alcanzado el estado de blastocisto.

Raza	Embri. obtenidos	Embri. vitrificados	Rendimiento
Duroc	1.021	557	54,55%
LW - LD	310	165	53,23%

Para finalizar, diremos que los estudios realizados para determinar la viabilidad de los embriones sometidos al proceso de vitrificación muestran que el propio proceso implica una reducción o pérdida viabilidad del 60%, es decir, cuando realizamos esta técnica podemos conseguir un porcentaje de supervivencia embrionaria del 40% (Conde P. et al., 2002).

Todos estos aspectos se deben tener muy en cuenta a la hora de planificar y desarrollar programas encaminados a la obtención de embriones y crioconservación de los mismos. ■

Nota. Trabajo realizado gracias a la concesión del proyecto de investigación nº 09 - 0074-2000. Vitrificación de embriones en la especie porcina. Comunidad de Madrid. Dirección General de Investigación. Consejería de Educación.