



Marcadores moleculares de la calidad espermática

Peter Sutovsky, PhD*, Kyle Lovercamp, PhD**

La evaluación microscópica es una piedra angular del análisis del semen, tanto en animales de granja como en andrología humana, proporcionando información útil sobre la muestra de semen. Sin embargo, las pruebas convencionales se basan en la evaluación subjetiva de los rasgos de los espermatozoides y tienen un limitado valor pronóstico de los resultados de la asistencia a la fertilización. Además, algunos casos de infertilidad masculina pueden ser diagnosticados erróneamente como idiopáticos, porque ciertos tipos de anomalías espermáticas suceden a nivel molecular, a veces con ausencia de manifestaciones morfológicas detectables por microscopía.

Introducción: nuevos enfoques para el análisis de semen

Para abordar este problema, las anomalías estructurales y moleculares de los espermatozoides humanos defectuosos pueden ser reveladas por una serie de biomarcadores. Estos incluyen marcadores fluorescentes de estatus acrosómico, fluorocromos en detección de los espermatozoides alterados de la cromatina o de la integridad del ADN, colorantes de vida, que revelan la actividad espermática mitocondrial, las sondas de detección de apoptosis y detección de anticuerpos de proteínas (arriba-abajo) que están regulados en los espermatozoides defectuosos.

Muchos de estos biomarcadores son las mejores pruebas obtenidas por citometría de flujo que, en contraste con el análisis de microscopía, permite una medición rápida, automática y objetiva de la abundancia relativa de estos biomarcadores en miles de células por muestra.

La evaluación espermática microscópica permite a los andrólogos determinar la localización subcelular de biomarcadores específicos. Sin embargo, la intensidad relativa de la clasificación por microscopía sólo puede ser estimada en un pequeño número de células (100-200 por cada muestra).

En suma, la citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia, en combinación con biomar-

dores de calidad/fertilidad del esperma son técnicas muy útiles en andrología. Sin embargo, pocos marcadores biológicos existentes de la calidad del esperma se correlacionan bien con el área de la fertilidad de los animales de granja machos.

Enfoque de marcadores negativos

La estrategia que hemos construido se basa en la identificación de biomarcadores de la calidad de la fertilidad masculina del esperma en los análisis de proteómica, bioquímicos y inmunocitoquímicos de espermatozoides defectuosos. Buscamos proteínas o ligandos (sustancias que actúan sobre receptores del organismo) que son únicamente asociados con los espermatozoides defectuosos ricos en defectos morfológicos, o sutiles, pero defectos ocultos críticos, tales como saltos de la cadena de ADN no detectables en el análisis microscópico convencional. Estos marcadores están asociados con la mala calidad del semen y la reducción de la fertilidad, lo que justificó la designación de marcadores "negativos" de fertilidad.

Hasta la fecha hemos identificado los siguientes marcadores potenciales de la fertilidad masculina:

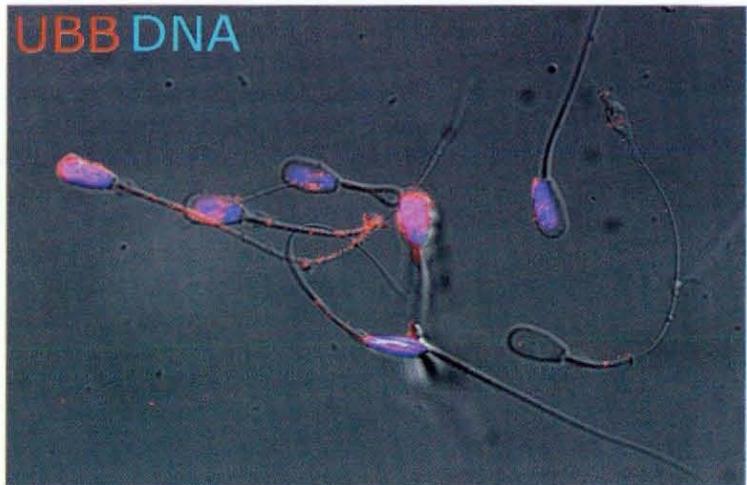
← **Ubiquitina.** Está asociada con la superficie de los espermatozoides defectuosos de seres humanos (Sutovsky et al., 2001b), toros (Sutovsky et al., 2002), verracos (Lov-

ercamp et al., 2007), sementales (Sulovsky et al., 2003) y ratas (Tengowski et al., 2007).

- ◀ **El 15-lipoxigenasa (15LOX).** Se enriquece con diversos componentes de UPP en las gotas citoplasmáticas de espermatozoides de verraco (Fischer et al., 2005) y puede ser utilizado como un indicador negativo de la calidad del semen (Lovercapm et al., 2007).
- ◀ En espermatozoides humanos, hemos encontrado que la línea germinal masculina **SPTRX3 tiorredoxina** esta asociada con un citoplasma superfluo de espermatozoides defectuosos (Jiménez et al., 2004), mientras que este no parece ser el caso en especies de animales de granja (estudios en curso).
- ◀ En la otra cara de nuestro enfoque de marcadores negativos, encontramos que el **factor activador-receptor de plaquetas (PAFr)**, presente en la superficie normal de los espermatozoides, está expresado en la superficie del espermatozoide defectuoso de toro, aunque su presencia en la superficie de leucocitos contaminan las muestras de semen y esto podría aumentar la presencia de esta molécula en las muestras de pobre calidad (Sutovsky, et al, 2007).
- ◀ **Arylsufatase A (ASA)**, otra proteína presente en la superficie de los espermatozoides asociada con la fertilidad normal, es ubiquitinada y entonces disminuye su presencia en la superficie de los espermatozoides defectuosos de toros.
- ◀ Varias **lectinas** están siendo probadas por su capacidad para reconocer glicosilación en la superficie alterada de los espermatozoides defectuosos.

La ubiquitina como biomarcador de la calidad y fertilidad del semen

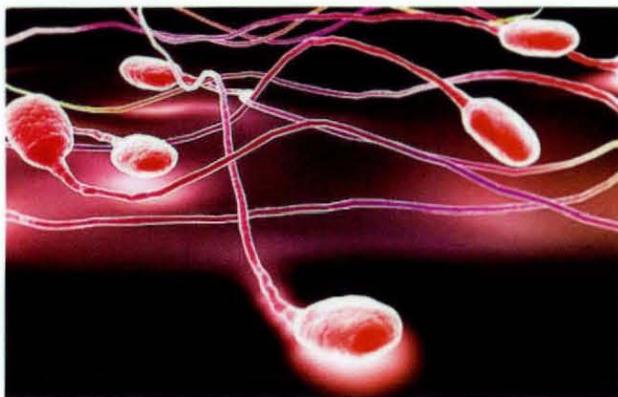
Nuestro laboratorio está particularmente interesado en la ubiquitina, explorando su funcionamiento en la espermatogénesis, la maduración de espermatozoides del epidídimo, así como en la fertilización y el desarrollo del embrión de preimplantación. La ubiquitina (UBI) es una pequeña proteína chaperona que se une covalentemente a residuos Lys de proteínas destinadas a la degradación proteolítica por proteosoma 26S, una subunidad proteolítica multi-holoenzima. Las proteínas son específicas para ubiquitinización por replegamiento, glicosilación alterada, oxidación, reducción del disulfuro o para el desarrollo/programación celular (revisado por Glickman y Ciechanover, 2002).



Ubiquitina en esperma de verraco FK1.

Aunque algunas veces se perciben como una vía de limpieza, la UPP sirve para una precisa variedad de eventos de señalización regulados durante el ciclo celular, control de la transcripción, volumen de trabajo de los receptores de la membrana, y está involucrado en una gran variedad de patologías celulares, que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la cirrosis hepática y la infección por VIH (revisado por Glyckman y Ciechanover, 2002.). En última instancia, el cordón de sustrato de proteínas con una multi-cadena de ubiquitina de cuatro o más moléculas predestina a dichas proteínas a la degradación proteolítica por proteosoma 26S.

El proteosoma 26S es un complejo de proteasa multi-subunidad de ~2 MDa compuesto por el complejo regulador 19S (17 subunidades; papel: el reconocimiento del sustrato ubiquitinado, desubiquitinación y preparación) y 20S central (14 subunidades; papel: la degradación del sustrato). Algunas interacciones sustrato-proteosoma y las interacciones entre las subunidades 19S están mediadas por el ATP de la subunidad 19S que requieren ATP. Otras medidas de reconocimiento de sustrato y preparación en el complejo 19S (mantenimiento de las subunidades 19S-ATPasa), así como de la proteólisis real en el núcleo del 20S no es dependiente de ATP. Como resultado de nuestro trabajo y de otros, hay un consenso sobre la relación de la proteólisis del esperma afectado por ubiquitina y las proteínas de ovocitos por el proteosoma 26S para el éxito de la fecundación de los mamíferos, pero sin estar limitado a la excitosis acrosómica (EA) y la penetración pelúcida de la zona espermática (ZP). Del mismo modo, hemos demostrado que la UPP es necesaria para la eliminación de las mitocondrias paternas tras la fecundación, una observación que explica el dogma básico de la bi-



ología comportamental y evolutiva: el de la herencia estrictamente materna del ADN mitocondrial de humanos y de otros mamíferos (revisado por Baska y de Sutovsky, 2005).

El fundamento de nuestra investigación sobre UPP durante la gametogénesis y la fertilización se consolidó por nuestra observación de que los espermatozoides de los mamíferos, con un defecto visible u oculto, adquieren ubiquitina durante la maduración de los espermatozoides en el epidídimo (Sutovsky et al., 2001a). Eventualmente, desciframos la UPP que opera en los fluidos del epidídimo de los mamíferos gracias a un mecanismo de secreción apócrina, por el cual todos los componentes enzimáticos necesarios de UPP se introducen en el fluido del epidídimo y son libres de mezclarse con los espermatozoides maduros (Baska et al., 2008). Este concepto está siendo ahora reconocido como una función extracelular, no tradicional, de UPP, que se extiende más allá del sistema reproductivo.

¿Qué hace que los espermatozoides defectuosos sean reconocibles a UPP? En general, es el daño proteico por el plegamiento/desplegamiento, la oxidación, reducción de disulfuro, desglicosilación (Glickman y Ciechanover, 2002). En cuanto a la glicosilación alterada, observamos que los espermatozoides defectuosos de toro con etiqueta de ubiquitina adquieren la capacidad de obligar a la lectina de LCA, que tiene gran afinidad por el azúcar con glicoproteínas. Esto sugiere que las glicoproteínas de la superficie espermática podrían disminuir en los espermatozoides con epidídimo defectuosos por alfa-manosidasa, una de las abundantes glicosidasas del fluido del epidídimo. Alternativamente, las glicosilasas del líquido del epidídimo podrían reconocer la superficie de los espermatozoides alterados y adjuntar glicanos inmunoprotectores a la superficie espermática,

como se observó en espermatozoides humanos ubiquitinados.

Estudios de ubiquitinación espermática en animales de granja

Utilizamos la citometría de flujo como principal herramienta para la medida de información objetiva, automática y estadística de los niveles relativos de los marcadores en las pruebas con animales de granja y en las muestras de semen humano. En nuestros estudios de campo con animales de granja hicimos las siguientes observaciones:

- ← La ubiquitina se correlaciona positivamente con la fragmentación del ADN de espermatozoides de toro (n = 9 toros; Sutovsky et al., 2002).
- ← Cambios estacionales en los niveles de ubiquitina de sementales (n = 4; Sutovsky et al., 2003), reflejando la estacionalidad de la producción y de la calidad del semen de sementales.
- ← La ubiquitina se correlaciona negativamente con los parámetros del semen convencional (recuento de espermatozoides, movilidad, morfología normal...), pero positivamente con los niveles relativos a la superficie de las plaquetas del espermatozoides asociado con el factor activador-receptor (PAFr) de proteínas en novillos sometidos a evaluación inicial (n = 244; Sutovsky, et al., 2007).
- ← El contenido en el semen de 15-LOX medido por citometría de flujo se correlaciona negativamente con el tamaño de la camada, mientras que la ubiquitina mostró correlaciones negativas tanto con el tamaño de la camada como con las tasas de parto (n = 19 verracos; Lovercamp et al., 2007). Tanto 15-LOX como la ubiquitina se correlacionan positivamente con el porcentaje de CD-transportador de los espermatozoides en el semen porcino (Lovercamp et al., 2007).

Importancia de la gota citoplasmática en espermatozoides de verraco

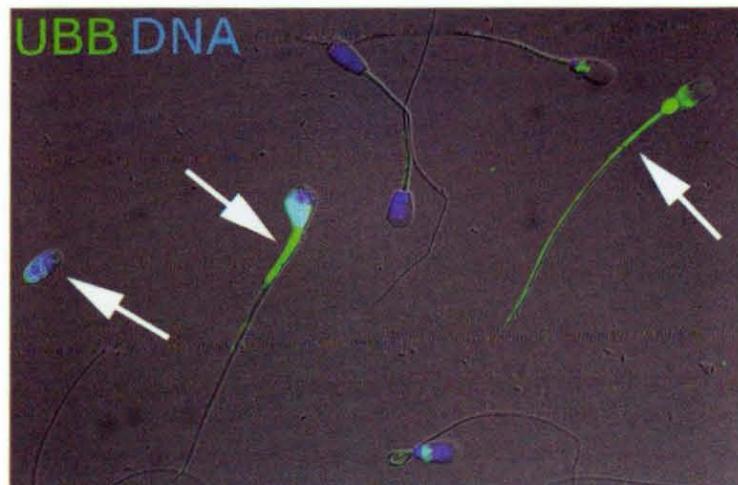
La ubiquitina y otros componentes de UPP se acumulan en la gota citoplasmática del espermatozoides de verraco (CD) y puede ser utilizado para la medición automática del contenido de espermatozoides en el semen de un animal (Fischer et al., 2005). La transmisión de espermatozoides CD es una de las anomalías más extendidas y peor entendidas en la eyaculación de los verracos. El CD es una membrana cerrada en la vesícula del citoplasma celular que permanece

unida a la pieza intermedia de la cola de espermatozoide después de la finalización de la espermatogénesis en el testículo. Los estudios especializados utilizando microscopía han determinado la forma y el tamaño del CD de mamíferos, en general esférica y de 2-3 μm de diámetro.

Durante la evaluación microscópica, los CD se pueden observar conectados o separados de los espermatozoides. Cuando están junto al espermatozoide, los CD están asociados con la pieza intermedia de la cola en uno de dos lugares posibles: en el extremo proximal de la pieza intermedia; es decir, cerca de la cabeza del espermatozoide (CD proximal) o situado en el extremo distal de la pieza intermedia (CD distal); es decir, en la unión de la pieza intermedia y la de principio de la cola de los espermatozoides. El CD distal también puede estar asociado con la cola de los espermatozoides, anomalía conocida como reflejo de la pieza intermedia distal. Por último, el CD también se puede observar desprendido de la cola de los espermatozoides y de libre flotación en el eyaculado (CD suelto). Este tipo se puede observar de forma individual o en agrupaciones presentes en el semen de verraco.

La formación de CD se produce durante la espermatogénesis, cuando en el proceso de formación los haploides del espermatozoide maduran primero como una célula espermática alargada y, finalmente, en un espermatozoide completamente diferenciado. La formación de CD se inicia cuando el citoplasma celular residual es sacado de la espermátida alargada y es retenido y destruido por las células de Sertoli, las células del desarrollo del epitelio seminífero. Cuando el tallo espermático, que conecta el citoplasma celular residual al CD es cortado, una pequeña cantidad de citoplasma permanece unida a la pieza intermedia de la cola del espermatozoide. Esta pequeña cantidad de citoplasma es el CD. Todas las células de espermatozoide de nueva formación en los testículos poseen un CD proximal, después de la espermatogénesis.

Después de la espermatogénesis, los espermatozoides pasan de los testículos al epidídimo, que es una glándula tubular situada en la parte exterior de los testículos. El epidídimo consta de tres áreas contiguas: la cabeza (caput), el cuerpo (corpus) y la cola (cola). Los espermatozoides viajan a través del epidídimo por un período que ronda entre los 7 y los 14 días, dependiendo de la especie. Es durante ese tránsito epididimal cuando los espermatozoides maduran y se vuelven fértiles. Cuando se liberan en el testículo, todos los espermatozoides poseen ya una unidad de CD proximal.



Ubiquitina en espermatozoide de toro.

tozoides maduran y se vuelven fértiles. Cuando se liberan en el testículo, todos los espermatozoides poseen ya una unidad de CD proximal.

Como el espermatozoide pasa de la cabeza del epidídimo hasta el corpus, el CD se desplaza por la pieza intermedia de la zona proximal a la posición distal. Todavía no se comprende por qué mecanismos de movimiento del CD se producen en el epidídimo. A raíz de la migración a la posición distal, el CD puede ser liberado en la región de la cola del epidídimo en algunas especies. Sin embargo, en el jabalí la mayoría de los espermatozoides del epidídimo todavía poseen un CD en la posición distal, y algunos espermatozoides poseen un CD en la posición proximal. Durante la eyaculación, o inmediatamente a partir de entonces, el CD puede ser liberado de los espermatozoides y encontrarse flotando libremente en el plasma seminal de la eyaculación.

Numerosas investigaciones han analizado la migración del CD en los cerdos y otras especies de animales de granja durante el tránsito del epidídimo. En el verraco, el porcentaje de espermatozoides con un CD proximal en los rangos del epidídimo ronda entre el 40-90%. Esta cifra se reduce alrededor de un 5-15% en el epidídimo de caballo. Por el contrario, el porcentaje de espermatozoides con rangos de CD distal está entre un 0-20% en la cabeza del epidídimo, llegando a 11-97% en la cola. No se sabe si el CD que se forma en los espermatozoides sirve para un determinado propósito durante la maduración de los espermatozoides o la fertilización, o si el CD es simplemente un desecho remanente tras completarse la espermatogénesis.



De una revisión de la literatura es difícil concluir lo que podría considerarse un porcentaje "normal" de los espermatozoides en el CD del verraco. El rango "normal" para los espermatozoides que poseen CD parece ser entre un 10 a un 15% en la eyaculación de un verraco (Waberski et al., 1994; Lovercamp et al., 2007b), aunque se ha informado de porcentajes aún más altos. Tales discrepancias podrían ser causadas por la variedad de calidad del semen en la muestra de verraco, o bien por diferencias en la evaluación microscópica del semen. Entre los posibles factores que causan la retención de la unidad de CD por los espermatozoides eyaculados son la temperatura del semen subóptima, la temperatura ambiental del macho, fundamentalmente por el calor, exposición química tóxica para la reproducción, falta de madurez sexual, mala alimentación, enfermedades, tales como PRRSV, los cambios de fotoperíodo y la frecuencia irregular de recolección.

En varios estudios recientes, se ha sugerido la relación entre la frecuencia de espermatozoides con CD y la fertilidad del verraco. Waberski et al. (1994) descubrieron que el espermatozoide con CDs extendido en verracos tiene relaciones perjudiciales con las tasas de fecundidad y el tamaño de la camada. Los autores observaron que el CD representa la anomalía morfológica más frecuente en los espermatozoides de los verracos modificados genéticamente.

En un estudio *in vitro* realizado por Petrunkina et al. (2001) se analizó el espermatozoide

para explantes del epitelio del oviducto de cerdo. Se cree que el espermatozoide se une al epitelio del oviducto para que tenga éxito la fertilización. Hubo una correlación negativa significativa del porcentaje de espermatozoides con CD adjunto y espermatozoides vinculantes. Además, hubo una negativa correlación entre la motilidad de la muestra de semen y los porcentajes de espermatozoides con CD adjunto. Lovercamp et al. (2007a, 2007b) examinaron las relaciones entre los espermatozoides, los parámetros de morfología en eyaculados de verraco y los datos resultantes de la fertilidad (porcentaje de partos y el total de número de nacidos).

En este estudio se analizaron 71 eyaculaciones de 13 verracos que se utilizaron después para 1.754 servicios industriales. Los resultados mostraron estadísticamente correlaciones lineales negativas significativas para el CD distal y CD DMR con porcentaje de partos. Además, hubo una significativa correlación negativa lineal entre la tasa de partos y acumulados CD adjunto (CD proximal + CD distal + CD DMR). El análisis de regresión mostró que los espermatozoides con CD adjunto representaron el 30% de la variabilidad observado en el porcentaje de partos. Curiosamente, de ese 30%, el CD distal fue responsable del 20%, mientras que el proximal y el CD DMR fueron responsables del 6% y el 4%, respectivamente (KW Lovercamp, resultados no publicados). Estos resultados sugieren que el CD distal puede tener el efecto más importante sobre la tasa de partos en comparación con el CD proximal y CD DMR. Verracos que obtuvieron una tasa de parto por debajo del promedio tenían un mayor número de CDs distal y CD total, en comparación con los verracos que estaban por encima del porcentaje del promedio de partos. Para generalizar, la existencia de una relación entre la tasa de partos y el CD sugiere que en los verracos con mayor porcentaje de CD total adjunto se producen las tasas más bajas de partos y viceversa.

Conclusiones

En conjunto, nuestros estudios mostraron la utilidad de los marcadores negativos de fertilidad en la evaluación de la fertilidad de grandes animales machos. El objetivo fue determinar qué indicadores coincidían más estrechamente con las tasas de fecundación y el tamaño de la camada de cerdos. Ahora, estamos trabajando activamente en la comercialización y la

difusión de métodos sencillos para la industria de genética y reproducción, así como para los productores de animales de granja. También estamos desarrollando los ensayos para medir la actividad del esperma proteasómico, posiblemente reflejo del esperma fecundante potencial. Igualmente trabajamos en métodos basados en nanopartículas magnéticas para el agotamiento de los espermatozoides defectuosos de las muestras de esperma durante el procesamiento de semen para la criopreservación.

Por último, promovemos el desarrollo de nuevos instrumentos de citometría para su uso en animales de granja y andrología humana. Este esfuerzo incluye las aplicaciones andrológicas del instrumento ImageStream combinado con un citómetro de flujo para la adquisición rápida de imágenes con una cámara de gama alta, y el sencillo análisis de esperma con el citómetro de flujo Guava EasyCyte, distribuido por IMV Inc.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido apoyado por subvenciones del USDA-NRI, Fondo para las Ciencias de la Vida de Missouri, y Pfizer Inc. Nos gustaría agradecer a los colaboradores académicos y a la industria por su contribución esencial a la investigación realizada: al Dr. Tim Safranski (MU), Dr. Klaus van Leyen (U. de Harvard), William Herring (Smithfield, Inc.), Cliff Mariscal y el Dr. Mel de Jarnette (Select Sires Inc.), Eliza Roberts (ABS Global), Dr. John Diehl (Clemson U.), Dr. Bill Plummer (Calpoly), el Dr. Mark Tengowski (Pfizer), la Dra. Regina Turner (U. Penn), y el Dr. Enrique Clemente (Clemente Associates). Un agradecimiento especial para el Dr. Young-Joo Yi, el Dr. Gauri Manandhar, Katie Fischer, Kathleen Baska, Kathy Craighead y Miriam Sutovsky por su contribución esencial a nuestra investigación sobre biomarcadores de la calidad del esperma.

Datos de los autores

*Associate Professor of Animal Science and Clinical Obstetrics & Gynecology, Division of Animal Sciences, and Departments of Obstetrics, Gynecology and Women's Health. University of Missouri-Columbia.

** Assistant Professor of Animal Science, Department of Agriculture,

University of Central Missouri.

Bibliografía

- ← **Baska KM, Sutovsky P.** Protein modification by ubiquitination and its consequences for spermatogenesis, sperm maturation, fertilization and pre-implantation embryonic development. In: *New impact on protein modifications in the regulation of reproductive system*. Tokumoto, T, Ed., 2005. *Research Signpost, Kerala*; 83-114.
- ← **Baska KM, Manandhar G, Feng D, Agca Y, Tengowski MW, Sutovsky M, Yi Y-J, Sutovsky P.** Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *J. Cell Physiol.* 2008; 215:684-696.
- ← **Fischer KA, et al.** 2005. 15-lipoxygenase is a component of the mammalian sperm cytoplasmic droplet. *Reproduction* 130: 213-222.
- ← **Glickman MH, Ciechanover A.** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 2002; 82:373-428.
- ← **Jiménez A, Zu W, Rawe VY, Pelto-Huikko M, Flickinger CJ, Sutovsky P, Gustafsson J-A, Oko R, Miranda-Vizueté A.** Spermatoocyte/spermatid-specific thioredoxin-3, a novel Golgi apparatus-associated thioredoxin, is a specific marker of aberrant spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(33):34971-34982.
- ← **Lovercamp KW, et al.** 2007a. Arachidonate 15-lipoxygenase and ubiquitin as fertility markers in boars. *Theriogenology* 67: 704-718.
- ← **Lovercamp KW, et al.** 2007b. High resolution light microscopic evaluation of boar semen quality sperm cytoplasmic droplet retention in relationship with boar fertility parameters. *Syst Biol Reprod Med* 53: 219 - 228.
- ← **Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE and Schatten G.** A Putative, Ubiquitin-Dependent Mechanism for The Recognition and Elimination of Defective Spermatozoa in the Mammalian Epididymis. *J. Cell Sci.* 2001a; 114:1665-1675.
- ← **Sutovsky P, Terada Y and Schatten G.** Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Human Reprod.* 2001b; 16: 250-258.
- ← **Sutovsky P, Neuber E and Schatten G.** Ubiquitin-Dependent, Sperm Quality Control Mechanism Recognizes Spermatozoa with DNA Defects, as Revealed by Dual Ubiquitin-TUNEL Assay. *Mol. Reprod. Dev.* 2002; 61: 406-413.
- ← **Sutovsky P, Turner RM, Hameed S, Sutovsky M.** Differential ubiquitination of stallion sperm proteins: Possible implications for infertility and reproductive seasonality. *Biol. Reprod.* 2003 68, 688-698.
- ← **Sutovsky P, Plummer W, Baska K, Peterman K, Diehl JR, Sutovsky M.** Relative Levels of semen platelet activating factor-receptor (PAFr) and ubiquitin in yearling bulls with high content of semen white blood cells: Implications for breeding soundness evaluation. *J. Androl.* 2007; 28(1):92-108.
- ← **Tengowski MW, Feng D, Sutovsky M, Sutovsky P.** (2007) Differential expression of genes encoding constitutive and inducible 20S proteasomal core subunits in the testis and epididymis of theophylline- or 1,3-dinitrobenzene-exposed rats. *Biol. Reprod.* 2007; 76(1):149-163.
- ← **Waberski D, et al.** 1994. Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 145-151.

Estrategia en la alimentación de cerdas en preparto y lactación: ácidos grasos Ω_3 protegidos

Andrés Donadeu González-Coviella¹; Santiago Carbajosa Sánchez¹; Belinda Martín Prieto¹; Yolanda García Ejido²; José Luis Lorenzo González³; María Luisa Rosas Valverde³.

¹Grupo Omega de Nutrición Animal S.L. - ²S.A.T. Las Parras - ³Maporc S.C.

Introducción

En los últimos años se ha producido un considerable incremento productivo en las granjas, debido a dos mejoras fundamentales: el avance en las líneas genéticas y la estabilidad sanitaria.

El aumento en el número de los nacidos totales, nacidos vivos y destetados por camada, ha podido comprometer en muchos casos, el tamaño de los lechones al nacimiento y al destete, y al mismo tiempo la condición corporal de la cerda.

La necesidad de mejorar los niveles de alimentación de la cerda en lactación debe ser contemplada no solamente desde el punto de vista del manejo, incrementando la cantidad de dieta diaria, sino también en la calidad de la misma, buscando una mayor eficiencia en algunos de los nutrientes que consideramos claves en el desarrollo de los lechones.

1. Antecedentes

El efecto beneficioso de los ácidos grasos Ω_3 (cardiovascular, inmunitario...) ha sido comprobado con numerosos estudios en alimentación humana, existiendo una clara tendencia en el mercado a ofrecer alimentos enriquecidos. Por otro lado, también se ha estudiado el efecto beneficioso en el desarrollo cognitivo de los niños en función de los hábitos alimentarios de sus madres con dietas ricas en Ω_3 , y/o según características antropométricas en las mujeres, con depósitos de grasa localizados en caderas y muslos (mayor concentración en Ω_3). Estos estudios realizados en la Universidad de Pittsburgh y California sobre 16.000 mujeres (publicado en *Evolution and Human Behavior*) han concluido mediante test de inteligencia que los niños tienen un mayor coeficiente. En este sentido, está documentada la transmisión desde la madre al feto de los efectos positivos por los ácidos grasos Ω_3 pudiendo ser de origen exógeno (alimentación), o endógeno (determinadas localizaciones de depósitos grasos).

En nutrición animal, y durante los últimos años, ha habido muchos trabajos de investigación sobre el

efecto en los lechones al suplementar las dietas de las cerdas con ácidos grasos Ω_3 (EPA y DHA).

Los estudios publicados se basan en dos consideraciones:

- ← En las dietas de las cerdas (basadas en cereales), la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (EPA y DHA) es prácticamente nula, siendo la relación Ω_3/Ω_6 muy baja.
- ← El cerebro y la retina de los lechones nacidos contienen altas concentraciones de DHA procedente de síntesis endógena, por el contrario en el cerebro de los fetos, que se desarrolla sobre todo en la fase final de la gestación, estos niveles de DHA pueden no alcanzar los niveles necesarios para afrontar con éxito su propia viabilidad.

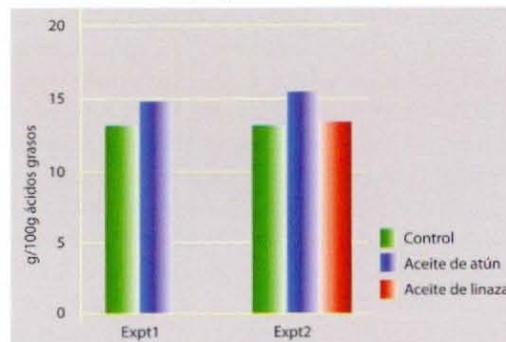


Gráfico 1: DHA en tejido cerebral del lechón (Rooke et al, 1998, 2000).

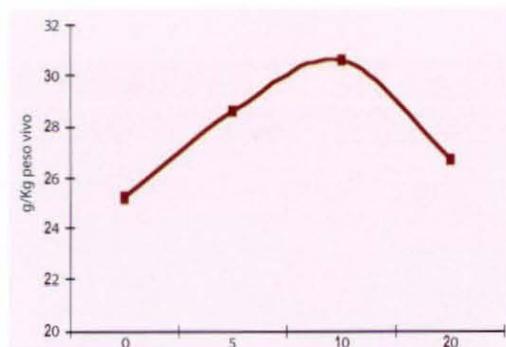


Gráfico 2: Peso del cerebro del lechón y consumo de aceite de pescado en la cerda. (Rooke et al, 2001).

En el gráfico 2, se puede comprobar que el aporte graso, en forma de aceite de pescado, en la dieta de la cerda tiene un límite: por encima de los 10 gramos de aceite de pescarIn por cada Kilo de pienso, el peso relativo del cerebro del lechón disminuye. La viabilidad de los lechones, valorada en función de los índices de mortalidad en las camadas también ha sido cuantificada en diferentes trabajos de investigación (gráfico 3).



Gráfico 3: Mortalidad en lactación (Rooke et al, 2001).

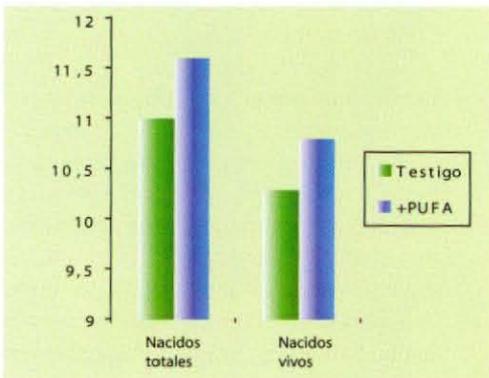


Gráfico 4: Beneficios en el siguiente ciclo (Webel et al, 2003).

Así mismo, el efecto beneficioso al suplementar con ácidos grasos Ω_3 en la dieta diaria de las cerdas durante la lactación y desde el destete hasta la cubrición, sobre el tamaño de la camada en el siguiente parto, fue valorado por Webel et al, 2003 (gráfico 4).

2. Aplicación práctica en la alimentación

En Grupo Omega de Nutrición Animal, y durante los últimos cinco años, se han desarrollado técnicas de aplicación práctica de ácidos grasos Ω_3 en la alimentación para porcino, avicultura de puesta y carne, así como vacuno lechero. Para ello se han realizado proyectos de investigación, cuya finalidad ha sido diseñar un producto estable, cuya aplicación asegure una respuesta eficaz.

En las experiencias desarrolladas, ha sido fundamental: la elección del aceite más idóneo, su estabilización para mantener constantes sus propiedades, y el incluir otros aditivos o nutrientes que potencien el efecto deseado.

La existencia de una gran variedad de aceites de pescado también hace muy variable las concentraciones de ácidos grasos Ω_3 , dependiendo de la naturaleza de ese pescado: tipo de habitad (mar o río), temperatura del agua, alimentación (libre o piscifactorías)... Las concentraciones más altas en Ω_3 (EPA y DHA), y disponibles en el mercado se corresponden a la familia *Engraulidae* (anchoveta), cuya captura se realiza preferentemente en aguas frías de la costa oeste sudamericana.

El manejo del aceite de pescado como materia prima es complejo, ya que es muy poco estable, siendo muy susceptible al enranciamiento por reacciones de peroxidación. Diseñando un producto en forma sólida, estabilizado incluso para condiciones extremas de temperatura, y con una alta concentración de aceite nos ha permitido su utilización práctica.

Pero las ya comentadas situaciones que nos encontramos en la producción porcina actual, nos ha obligado a potenciar los efectos beneficiosos de los ácidos grasos Ω_3 , diseñando un suplemento dietético compuesto por una serie de aditivos capaces de incrementar el efecto que sobre la cerda y los lechones tienen estos ácidos grasos.

Así, la utilización de aditivos como Colina, L-carnitina, Bioflavonoides, β -carotenos y Ácido Linoléico Conjugado (CLA) entre otros, nos ha permitido incrementar la eficacia y el efecto de los ácidos grasos Ω_3 en la alimentación de las cerdas.

La **colina** es una parte integrante de la lecitina, y tiene un papel determinante en el transporte de grasas, aumentando el porcentaje de estas en la leche. Por otro lado, tiene efectos positivos sobre la fertilidad y vitalidad de los lechones al nacimiento pues reduce las incidencias en problemas del aparato locomotor.

Los **β -Carotenos** influyen positivamente sobre la fertilidad (mejorando la tasa de ovulación y disminuyendo el intervalo destete-cubrición). Además, numerosos estudios han demostrado su eficacia a la hora de aumentar la resistencia a las enfermedades neonatales de tipo infeccioso.

El suplemento adicional de **vitamina E**, tiene una influencia decisiva sobre el desarrollo y posterior función de las gónadas. Prepara a la cerda para la ovulación y posterior mantenimiento de la gestación. Además, su influencia beneficiosa sobre el sistema inmunitario permite aumentar el status sanitario tanto de la cerda como de los lechones.

Los extractos de cítricos presentes en su composición son la mejor fuente posible de **Bioflavonoides**. Este grupo de compuestos, han demostrado su eficacia frente a los procesos de oxidación de tejidos que forman parte del aparato reproductor, agilizando la renovación del endometrio y evitando

el deterioro de las células reproductoras. Además, su efecto sobre los patógenos digestivos más frecuentes en esta fase (Coli, Clostridios, etc.) reduce la mortalidad asociada a estas enfermedades.

La **L-Carnitina** mejora sensiblemente la eficacia del metabolismo energético, disminuyendo el gasto de glucosa. La movilización de grasa por parte de la cerda para hacer frente a las necesidades energéticas de esta fase, se reduce sensiblemente llegando al momento del destete en un mejor estado corporal.

CLA. Numerosos son los estudios que han demostrado la eficacia de estos “alimentos tecnológicos” como potenciadores del sistema inmunitario de los lechones. Así, Hontecillas et al. (2002) y Bassaganya-Riera et al. (2003) sometieron a los animales a diversas infecciones (bacterianas y víricas), y demostraron la acción beneficiosa del CLA al actuar sobre el sistema inmunitario. Su tasa de transferencia tanto en calostro como en leche es cercana al 60%, por lo que la adición vía alimentación materna, resulta la más conveniente a esas edades, facilitando sobremanera el manejo. Su acción está basada en el efecto inmunopotenciador que tiene sobre la respuesta inmunitaria humoral sistémica e intestinal durante las primeras etapas de la vida.

3. Propuesta de un método de trabajo: resultados obtenidos.

Algunos de los aspectos reseñados anteriormente serán expuestos a continuación, con las técnicas de manejo y de alimentación que desde Grupo Omega de Nutrición Animal, se han desarrollado para mejorar rendimientos productivos.

3.1. Condicionantes, cuya existencia justifican la utilización de un suplemento alimenticio.

Si a las consideraciones descritas anteriormente sobre el significativo incremento de la productividad en las cerdas durante los últimos años por mejora genética y mejora en el nivel sanitario de las explotaciones, añadimos la bibliografía recogida de las diversas experiencias científicas mencionadas anteriormente, y los resultados expuestos en este trabajo, se justifica la necesidad de valorar la calidad de la grasa utilizada en la fabricación de los piensos de las cerdas en lactación.

En este sentido, y considerando las propiedades del aceite de pescado, recomendamos que permanentemente se incluya en la fabricación del pienso aceites con alta concentración de ácidos grasos Ω_3 , incorporando en la valoración nutricional de las formulas el nutriente Ω_3 (**nut Ω_3**), sobre el cual se valoran y optimicen los costes de formulación.

← **Épocas y/o zonas de calor:** en la medida en que las altas temperaturas condicionan el nivel de ingesta de las cerdas en lactación, se hace imprescindible un incremento en el nivel de **nut Ω_3** . Las altas temperaturas interviene de forma negativa sobre el consumo de pienso por parte de la cerda. Esto trae como consecuencia una disminución en la producción de leche así como una dilución de los nutrientes presentes en la misma.

A nivel práctico los requerimientos mínimos en formulación a lo largo del año de **nut Ω_3** los establecemos en 0,05%, incrementando este nivel a 0,08% en épocas de calor. Desde la aplicación de este sistema de trabajo hemos modificado, con unos resultados muy satisfactorios, la calidad de la grasa utilizada, incrementando el nivel energético del pienso en base a grasa, no en base a hidratos de carbono, pues de esta manera el consumo podría verse reducido.

← **Cerdas primíparas:** este tipo de cerdas pueden requerir en función de la edad, el peso a la primera cubrición, y el tamaño de la camada, una suplementación de ácidos grasos Ω_3 , ya que, teniendo en cuenta que su capacidad de ingesta durante la lactación es sensiblemente inferior a las cerdas adultas, es de vital importancia la menor pérdida posible en su condición corporal (Grasa Dorsal) para afrontar con éxito el siguiente ciclo.

← En cerdas con una **condición corporal comprometida** al final de Gestación – Parto (fGP), cuya capacidad para movilizar sus reservas está limitada, justifica la suplementación de ácidos grasos Ω_3 protegidos ya que se incrementan las concentraciones de EPA y DHA en leche, reduciendo la movilización de sus escasas reservas (efecto BY-PASS).

← **Camadas numerosas y/o escaso peso al nacimiento:** el efecto de la suplementación de ácidos grasos Ω_3 durante al menos 7 días antes del parto ha mejorado considerablemente la mortalidad y crecimiento de los lechones durante la lactación en todas las pruebas realizadas.

3.2. Resultados obtenidos.

En todas las pruebas realizadas durante estos dos últimos años se han obtenido mejoras muy significativas en los diferentes parámetros medidos. En todas ellas, la administración de los suplementos alimenticios se ha realizado manualmente sobre el pienso, administrado en las cerdas desde siete días antes del parto y durante la lactación hasta

el destete a unas dosis de 200 gr/cerda/día. Este diseño de pruebas nos ha permitido cuantificar las diferencias entre lotes control y testigo. En la actualidad existen empresas que ya han incluido los ácidos grasos Ω_3 protegidos como un ingrediente más en la formulación de los piensos.

a. Modificación en la calidad de la leche.

Para valorar esta suplementación, se ha realizado, en la mayoría de las pruebas, análisis de la leche de las cerdas para comparar analíticamente su eficacia.

calidad de la leche	TESTIGO	CONTROL SOWFAT	incremento
Granja A (Sorla). Día 7			
% GB	7,2	9,9	38%
% EPA	0,06	0,27	350%
% DHA	0,45	0,83	84%
Granja B (Segovia). Día 12			
% GB	7,9	8,1	3%
% EPA	0,02	0,27	1250%
% DHA	0,13	0,78	500%
Granja C (Toledo). Día 7			
% GB	7,7	7,9	3%
% EPA	0,01	0,07	600%
% DHA	0,11	0,51	364%
Granja D (Lérida). Día 8			
% GB	7,5	8,2	9%
% EPA	0,04	0,21	425%
% DHA	0,15	0,69	360%

Tabla 1: Resultados en la calidad de la leche en diferentes explotaciones.

Evolución en la calidad de la leche	TESTIGO	CONTROL SOWFAT	incremento
Día 0			
% GB	4,35	4,65	7%
% EPA	0,08	0,69	763%
% DHA	0,28	1,12	300%
Día 12			
% GB	7,9	8,1	3%
% EPA	0,02	0,27	1250%
% DHA	0,13	0,78	500%
Día 22			
% GB	7,1	7,4	-4%
% EPA	0,02	0,15	650%
% DHA	0,13	0,31	138%

Granja B (Segovia).

Tabla 2: Evolución en la calidad de la leche en una misma lactación.

En la tabla nº1 y nº2, se pueden apreciar los resultados obtenidos en cada una de las explotaciones donde se han realizado cromatogramas completos de la leche. En este trabajo se reseñan los valores en los ácidos grasos Ω_3 (EPA y DHA).

En la tabla nº1, se reflejan los resultados en los muestreos recogidos en las explotaciones entre el día 7 al 12 de lactación.

En todas ellas se puede apreciar un incremento en los valores de Grasa Bruta. A este respecto y en nuestra opinión, son valores que no deben ser con-

siderados como un efecto directo en la suplementación, ya que en la variabilidad de la composición de la leche existe un factor determinante, y es el orden de eyección o tiempo desde la última eyección, variando mucho las concentraciones en función de la mayor o menor acumulación de leche en la glándula mamaria. Este punto queda confirmado observando la tabla nº2, en la que el nivel de GB en cada una de las muestras recogidas (día 0, 12 y 22) se mantiene superior en el Grupo Control. Siendo la suplementación constante a lo largo de la lactación con 200 gr/cerda/día, se podría entender un efecto en los primeros días, ya que sobre una ingesta de 1 a 1,5 KG de pienso, representaría entre un 13 a 20% de la ración diaria, pero no así al final de la gestación donde solamente representaría del orden del 2 al 3%.

Por el contrario los valores alcanzados en EPA y DHA son significativamente superiores en el Grupo Control, manteniéndose en las muestras recogidas de todas las granjas (tabla nº1) y a lo largo de la lactación (tabla nº2).

En la tabla nº2, se puede comprobar que los niveles de EPA y DHA de la muestra de calostro (día 0) recogida en el grupo Testigo, es sensiblemente superior a los niveles en los días 12 y 22, aún sin ninguna suplementación exógena. Este hecho marca la relevancia y la importancia que tiene en el fisiologismo, la concentración de una mayor cantidad de estos ácidos grasos Ω_3 en momentos críticos en la vida del neonato como complemento de otros nutrientes de conocida acción inmunológica.

Es de resaltar que el resultado obtenido en la tabla nº2, la concentración de EPA y DHA en el día 22 del grupo Control es superior al día 0 (calostro) del grupo Testigo.

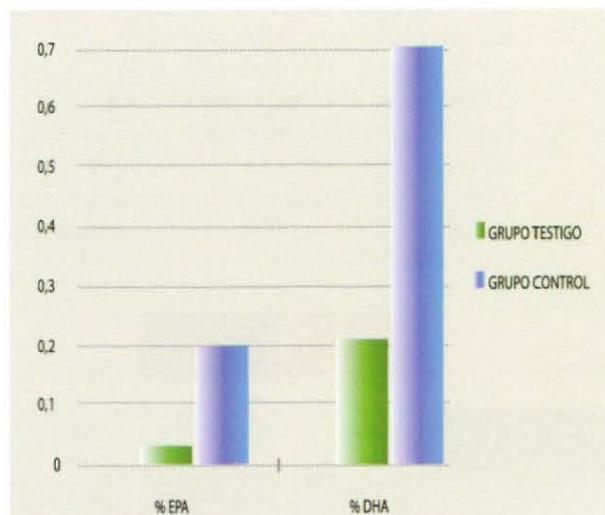


Gráfico nº5: Incrementos medios de EPA y DHA.



	TESTIGO	CONTROL SOWFAT	
mortalidad lechones			
Incrementos medios			
n° lechones INICIO (*)	11,02	10,96	-1%
n° lechones DESTETADOS	9,20	9,71	6%
% MORTALIDAD	16,5%	11,4%	-31%

Tabla 3: Mortalidad en lactación.

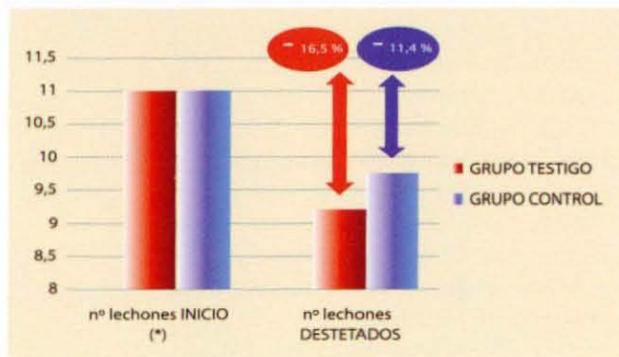


Gráfico n°6: Mortalidad de lechones en lactación.

En una valoración conjunta de las pruebas realizadas se ha comprobado un incremento en el lote Testigo con respecto al Control del orden de 7 veces superior en EPA y de 3 en DHA (gráfico n°5).

En todas las granjas los muestreos se realizaron sobre el 70 al 75% de las cerdas de ambos grupos. Se procedió a su respectiva homogeneización para enviar dos réplicas por grupo al laboratorio. Para facilitar la recogida se administró oxitocina a las cerdas.

b) Mortalidad de los lechones en lactación.

La viabilidad de los lechones se ha valorado en la prueba como variación en el porcentaje de mortalidad, y ha sido del mismo modo significativa en todas las granjas.

En las granjas incluidas en esta medición, los lechones INICIO se corresponden al número de lechones una vez igualadas las camadas, en el primer o segundo día después del nacimiento.

c) Crecimiento de los lechones en lactación.

En todas las granjas las diferencias en el peso de los lechones al nacimiento no han sido significativas entre el Grupo Testigo y el Control (suplementando la ración diaria desde 7 días antes del parto con los ácidos grasos Ω_3).

	TESTIGO	CONTROL SOWFAT	incremento
crecimiento lechones			
Incrementos medios			
peso inicial P ₀	1,616	1,658	0,042
peso final P ₁	5,547	6,127	0,580
Incremento peso (Kg/lechón)	3,931	4,469	0,538

Tabla 4: Crecimiento en lechones.

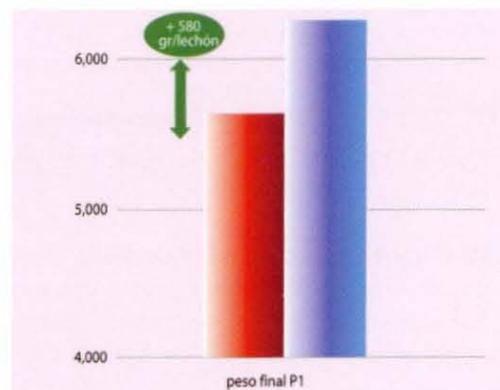


Gráfico 7: incremento peso al destete

En la mayoría de las explotaciones (no en todas), los operarios y técnicos transmitieron que los lechones del grupo Control presentaban, ya en la primera semana de vida, un mejor aspecto en la piel y una mayor actividad.

Este aspecto se pudo comprobar de forma más evidente en granjas con recientes episodios de PRRS. La edad media al destete en las granjas variaba entre los 20 a 22 días, y la diferencia del peso medio del Grupo Control con respecto al Testigo fue de 580 gr/lechón (gráfico n°7).

La mejora en el peso al destete, se debió en gran medida a una sustancial reducción en el número de lechones pequeños, observándose una mayor homogeneidad de las camadas al destete.

d) Condición corporal de la cerda (GD).

En todas las pruebas realizadas, se midió el espesor de Grasa Dorsal (GD) al parto (fGP) y al destete (DC). El objetivo de este estudio era comprobar el efecto en el estado corporal de la cerda, de los resultados observados y mencionados con anterioridad: incremento en el número de lechones destetados (reducción de la mortalidad) e incremento en el peso al destete. Para este estudio se midieron todas las cerdas, no encontrándose diferencias significativas en la edad de las cerdas (partos/cerda): 3,48 para el Grupo Testigo y 3,39 para el Grupo Control. Los resultados consolidados de todas las explotaciones se reflejan en los gráficos n°8 y n°9.

En el primer gráfico (n°8) se reseñan los resultados obtenidos en las mediciones de GD de las cerdas del grupo Testigo. La pérdida media de GD a lo largo de la lactación en este grupo es de 2,94 mm, la cual se considera normal encontrándose dentro de los resultados que habitualmente obtenemos en las granjas donde estamos trabajando desde hace años en el manejo de los piensos en reproductoras.

Por el contrario, y en el grupo Control (gráfico nº9) se puede comprobar que la pérdida media de GD es menor: 1,81 mm desde el parto hasta el destete. La diferencia en la pérdida de la condición corporal entre el grupo TESTIGO y CONTROL ha sido de 1,13 mm en la GD. En todas las explotaciones este aspecto también se ha repetido, y la diferencia siempre ha sido mayor a 1,0 mm.

Se considera altamente significativa la diferencia entre ambos grupos, y muy relevante si valoramos conjuntamente los dos parámetros obtenidos: mayor número de lechones destetados (+ 0,51 lechones / camada), y mayor peso al destete (+ 580 gr/lechón).

En la actualidad se están realizando mediciones en diferentes explotaciones sobre los siguientes parámetros reproductivos: días de salida al celo (Intervalo destete - celo) y fertilidad.

Del mismo modo, en granjas con una alta mortalidad y suplementando con 200 gr/día con **ácidos grasos protegidos Ω_3** desde 7 días antes de parto y hasta 10 días postparto, se están haciendo valoraciones en la mejora de este parámetro, y en el peso de los lechones más pequeños.

4. Conclusiones

- ← El incremento experimentado de los últimos años en la productividad de las granjas ha sido muy importante, pero en la mayoría de las ocasiones la calidad del lechón al nacimiento, y por lo tanto al destete ha quedado perjudicada.
- ← En muchas explotaciones se han planteado el incrementar la edad al destete para mejorar la calidad de los lechones.
- ← Otro aspecto que frecuentemente nos encontramos es que la condición corporal de las cerdas al destete ha empeorado, sobre todo si el número de lechones destetados se incrementa, y/o se aumenta la duración de la lactación.
- ← Las repercusiones de todos estos aspectos afectan tanto a aspectos productivos (viabilidad y desarrollo de los lechones) como reproductivos (días de salida a celo y/o fertilidad).
- ← Las medidas correctoras en el incremento de la cantidad de pienso en la dieta diaria durante la lactación tiene unos límites: capacidad de ingesta (determinada en muchas ocasiones por la genética), la dificultad en el manejo y las épocas de calor.
- ← Con la suplementación en los días previos al parto y durante la lactación con ácidos

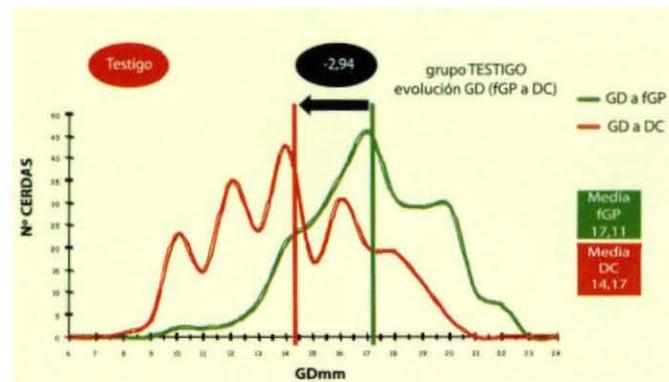


Gráfico 8: Evolución de GD en las cerdas en lactación del grupo testigo.

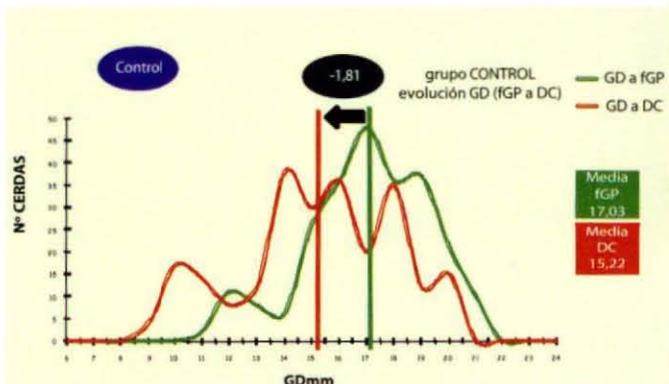


Gráfico 9: Evolución de GD en las cerdas en lactación del grupo control.

grasos Ω_3 protegidos, se han obtenido unos rendimientos extraordinarios en la calidad de los lechones y condición corporal de las cerdas. Las mejoras son más significativas en condiciones comprometidas: épocas o zonas de calor, y en cerdas primíparas, delgadas o muy prolíficas.

- ← En la actualidad hay empresas en las que se ha incluido como una materia prima más estos ácidos grasos Ω_3 protegidos. Valorándose y optimizándose la formulación con el nutriente: % de Ω_3 .
- ← La eficacia en los rendimientos se ha basado en el efecto de los ingredientes que se han incorporado junto a los ácidos grasos Ω_3 , y que han conseguido protegerlos de la degradación en los procesos digestivos.

Agradecimientos

Durante estos años, y para la elaboración de este trabajo se ha contado con la generosidad de empresas y personas que nos han facilitado tiempo y medios para ir normalizando este método de trabajo.