

Aplicación de la transferencia de embriones en ganado porcino

P. García¹, A. Toledano¹, C. Díaz Yubero¹, R. Sánchez¹ y P. Martín².

¹INIA. Dpto. de Reproducción Animal. Madrid.

²CIA Dehesón del Encinar. Oropesa (Toledo).

Actualmente, la producción de las razas porcinas, habitualmente llamadas blancas, está alcanzando niveles insospechados hace no muchos años. Nuestro país, sigue liderando el censo porcino europeo, junto con Alemania y es dependiente de la exportación. Hoy en día, con la gran experiencia adquirida por la gran mayoría de empresarios de ganado porcino, existe una alta calidad en la producción, consiguiéndose no sólo buenos datos productivos, sino unas condiciones de trabajo óptimas y unos sistemas de producción adaptados al bienestar animal, cuyo fin es mejorar las condiciones de todos los implicados en la producción.

El control de diferentes patologías en la explotación, es cada vez mayor, siendo monitorizados los animales que conforman la renovación, desde su lugar de origen, durante el transporte y posterior cuarentena. En la propia granja, los controles serológicos y los planes vacunales adecuados a cada zona geográfica y a cada explotación, hacen muy difícil la entrada de nuevas enfermedades, mejorando a lo largo del tiempo, la producción.

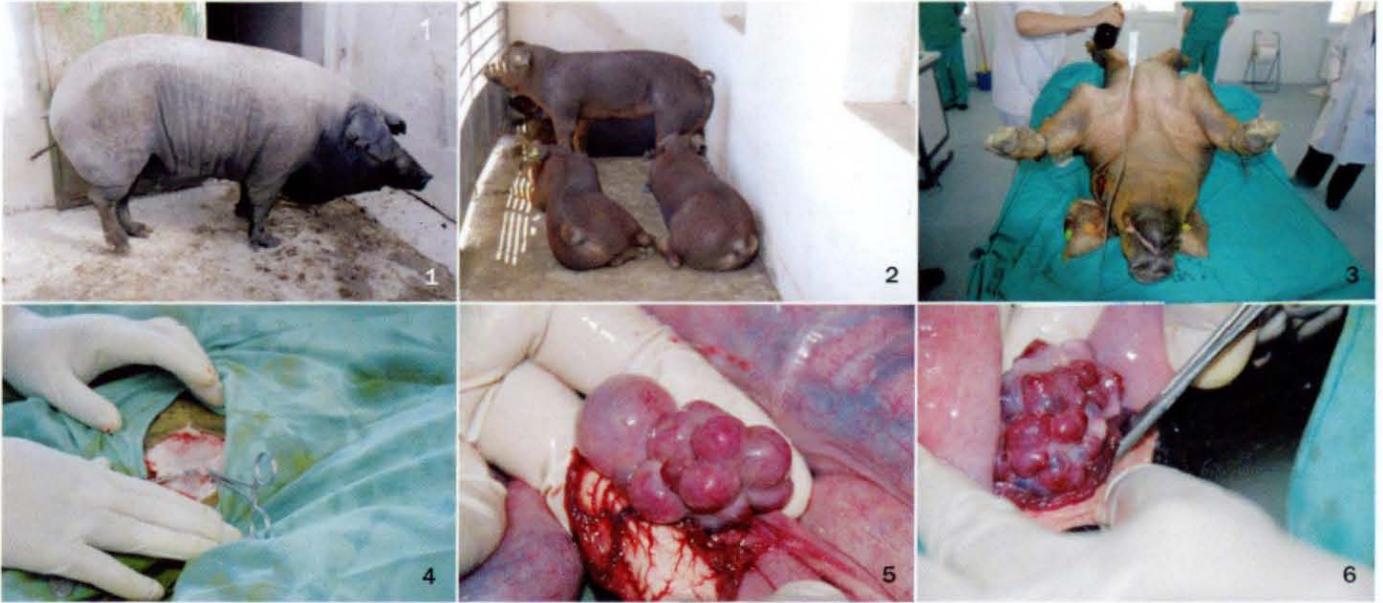
En este sentido, fue la implantación de la inseminación artificial, a lo que nos sentimos orgullosos de haber contribuido allá por los años 80 y 90, la primera aplicación de las "nuevas" biotecnologías de la reproducción, lo que contribuyó de forma clara y notoria, al desarrollo de la producción porcina en nuestro país, con un mayor

control de las enfermedades y un mayor aprovechamiento del potencial genético.

Otra de las técnicas reproductivas, que por diferentes motivos, como la anatomía de la cerda o la propia capacidad de reproducción, no se ha desarrollado lo suficiente y por tanto su aplicación no se ha implantado, es la transferencia de embriones. A diferencia con el ganado vacuno, donde es más habitual, bien por la anatomía del aparato genital de la vaca, bien por tener un periodo de gestación más largo y menos productivo que la cerda, el caso es que en el ganado porcino la aplicación de la transferencia de embriones ha estado limitada a la experimentación. Bien es cierto, que al no ser requerida por el ganadero, las investigaciones tampoco han sido muy exhaustivas y por ello, quedan temas por

resolver como la congelación de los embriones porcinos. Esto limita el tiempo de conservación, así como el transporte a largas distancias.

No obstante, sí que existen medios de cultivo capaces de mantener vivos a los embriones durante 3 a 4 días y en este periodo de tiempo, hoy en día, se podrían transportar incluso entre continentes, lo que facilitaría el intercambio de genética, abataría los costes y aseguraría sanitariamente a los diferentes países donde se llevaran esos embriones, frente a posibles enfermedades que hubiera en el país de origen y no en el de destino. Europa se ha convertido en un referente de genética para los países asiáticos y suramericanos, pudiendo aumentar la demanda si se pudiera demostrar que la técnica de transferencia embrionaria en el ganado porcino es eficaz.



Actualidad de la técnica

Las posibilidades de la transferencia de embriones hoy por hoy están limitadas por la propia anatomía del útero de la cerda. Al ser muy prolífica, los cuernos uterinos son largos y tortuosos, lo que dificulta en gran medida la obtención de los embriones por medio de un lavado uterino, como se hace en la vaca. Por tanto, la forma de realizar la obtención es por medio de una intervención quirúrgica. Básicamente, la técnica que nosotros utilizamos consiste en:

- Sincronización del ciclo estral entre la donante y la cerda receptora.
- Inducción del crecimiento folicular y ovulación mediante tratamiento con gonadotropinas.
- Recolección de embriones del oviducto.
- Selección de los embriones según su estado morfológico.
- Transferencia de los embriones depositándolos en el oviducto de la receptora.

En primer lugar, se seleccionan las cerdas. En las donantes, generalmente por su valor genético y por su historial productivo, se tendrá en cuenta que no hayan tenido problemas reproductivos. Suele ser habitual trabajar con cerdas

con varios partos y que sean de desecho, de tal forma que los ovarios respondan bien al tratamiento hormonal y después de la intervención, bien se la insemina de nuevo para llevar a cabo una última gestación, o bien se envía al matadero. Las cerdas receptoras pueden ser cerdas híbridas, sin valor genético, pero que igualmente no hayan presentado ningún problema reproductivo. Si son cerdas jóvenes, nulíparas, se tendrá en cuenta que hayan alcanzado bien la pubertad y que tengan los celos con regularidad.

Una vez seleccionados los animales, han de encontrarse en el mismo momento del ciclo reproductivo (Hazeleger *et al*, 2000). Para ello se utiliza un progestágeno como altrenogest (Regumate), administrándolo durante 18 días consecutivos. El efecto que conseguimos, es que el ovario siga su evolución normal, pero cuando se produce la involución de los cuerpos lúteos y tienen que comenzar a desarrollarse los nuevos folículos, el progestágeno frena la secreción del factor de liberación de gonadotropinas (GnRH) por parte del hipotálamo y por tanto, frena la secreción de FSH y LH por parte de la hipófisis, inhibiendo el crecimiento folicular. De tal modo, cuando se supri-

me el tratamiento, comienza de nuevo la acción de las gonadotropinas sobre los ovarios y en todas las cerdas comienza el crecimiento folicular al mismo tiempo.

A las 24 horas de la supresión del progestágeno, se administran la gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) en una dosis de 1.200 a 1.500 UI. Es importante que las hormonas se inyecten intramuscularmente y no se dejen depositadas en la grasa subcutánea ya que puede influir en su efecto sobre los ovarios. Entre 60 a 72 horas después, se administra la gonadotropina coriónica, cuya acción es la de inducir la ovulación de los folículos previamente formados. Generalmente se utiliza la mitad de Unidades Internacionales que las utilizadas con la PMSG.

Desde el momento que se induce la ovulación, comienza la formación del cuerpo lúteo y por tanto la secreción de progesterona. Si se provoca un desfase entre la cerda donante y la receptora, el embrión cuando llega al nuevo útero, se encontrará un ambiente correspondiente con su edad y son los propios embriones, los que con sus secreciones, ayudan a crear el ambiente uterino adecuado a su estado de desarrollo. Si ambas cerdas estuvieran en el mismo

momento reproductivo, el embrión transferido, encontraría un ambiente uterino algo maduro, ya que su desarrollo se ha ralentizado en el transcurso de la operación (Stroband y Van der Lende, 1990).

En la técnica que nosotros empleamos, llevamos a cabo un desfase de 12 horas entre la cerda donante y la receptora. Esta diferencia la conseguimos administrando a las cerdas receptoras la gonadotropina coriónica 12 horas después que a las donantes. De esta manera, la ovulación se produce más tarde en la cerda receptora y por tanto la formación de cuerpos lúteos y la consecuente secreción de progesterona, que es la hormona encargada de proteger la gestación.

obtención, bajo nuestro criterio, es de una mayor manipulación y un mayor riesgo a la formación de adherencias post-quirúrgicas, por lo que preferimos realizar una técnica con menor impacto para el aparato genital.

Intervención

En este caso describimos la técnica desarrollada con cerdas Ibéricas como donantes (**Foto 1**) y cerdas Duroc (**Foto 2**) como receptoras. Las imágenes nos permiten seguir los pasos descritos a continuación. Los animales preparados para la intervención quirúrgica, es decir, en ayunas 24 horas y sin administrarles líquidos al menos du-

pino, lavando y desinfectando todo el campo operatorio (**Foto 3**). La técnica utilizada es por medio de laparotomía media, incidiendo a la altura del último par de mamas (**Foto 4**) teniendo en cuenta la presencia de las venas mamarias. Según la edad del animal, estas venas serán más o menos importantes, por lo que se decidirá sobre la marcha, si es conveniente ligarlas antes de incidir. En el caso de ser un animal joven, estas venas no están muy desarrolladas y puede incidirse de forma roma. A continuación se atraviesan las distintas capas anatómicas e, incidido el peritoneo, se localizan los cuernos uterinos y realizando un deslizamiento de los dedos, se llega hasta el oviducto y el ovario.

El ovario, puede haber no reaccionado al tratamiento y en ese caso presentará folículos desarrollados, pero sin haber llegado a ovular (**Foto 5**). Esto puede ocurrir por diferentes motivos, aunque en muchos casos, como ya hemos señalado anteriormente, por una mala administración de las hormonas. En general, la reacción suele ser con un alto número de ovulaciones (**Foto 6**). Una vez comprobado el estado del ovario, se procede a la localización de la fimbria y la desembocadura del oviducto, por donde se introduce una cánula unos 8 cm y es fijada desde el exterior (**Foto 7**). El siguiente paso, es la localización de la unión útero-tubárica y con ayuda de un trocar penetramos desde el útero en el oviducto (**Foto 8**). Se utiliza un trocar con el fin de provocar un pequeño punto hemorrágico y que cicatrice rápidamente. Si se utiliza una aguja biselada, el corte es muy limpio y suele haber dificultad para cicatrizar. Dispuesto de esta manera, se hace un lavado con 20 ml de PBS (**Foto 9**), con el que se arrastran contracorriente los embriones ubicados en el oviducto. Para ello, se coloca una placa de Petri en el otro extremo de la cánula de silicona (**Foto 10**) la cual una vez llena, se traslada hasta una estufa o bien, una placa calefactora a 37

“

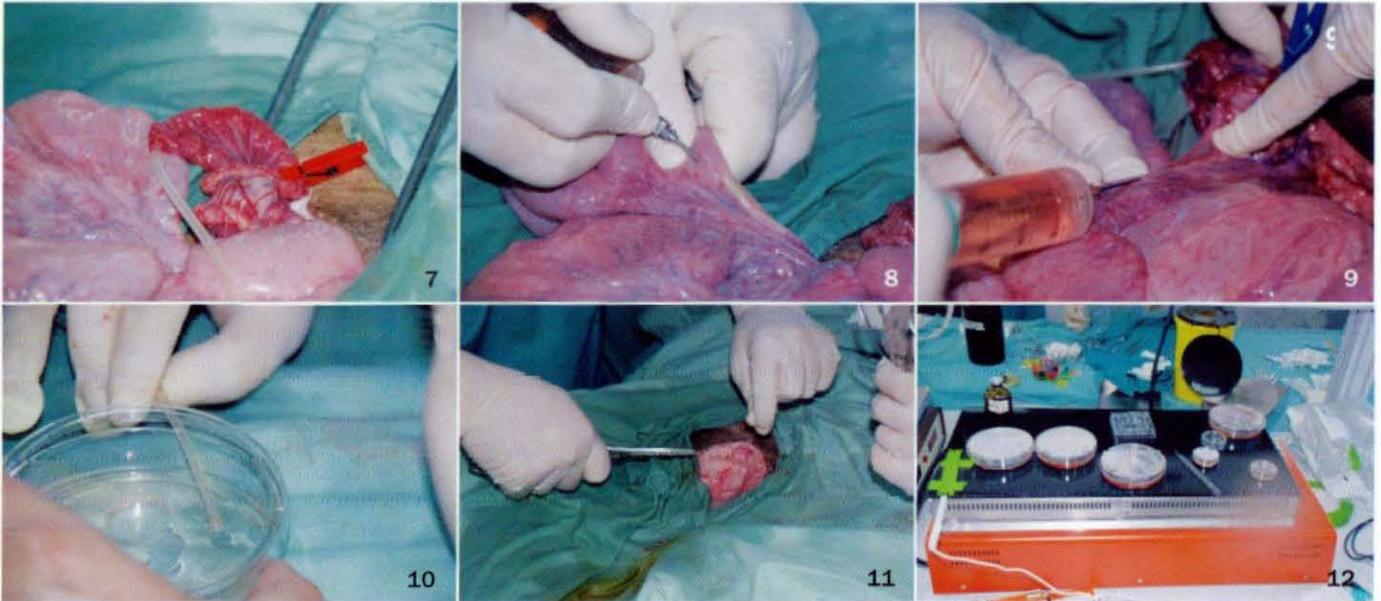
Con la técnica propuesta, se puede realizar la transferencia de los embriones *in situ*, de forma sencilla, sin abordar en exceso el aparato genital de la cerda, pudiendo una misma donante ser utilizada hasta 4 ó 5 veces

”

A las 24 y 48 horas de haber administrado la gonadotropina coriónica a las cerdas donantes, se realiza la primera y segunda inseminación artificial. Posteriormente, según el estado de desarrollo con que se quieran obtener los embriones, se realizará la intervención quirúrgica. En este caso, vamos a describir la obtención de los embriones en los primeros estadios de desarrollo, es decir, de una y dos células, para poder recogerlos desde el oviducto. Los embriones con un desarrollo de 4 células, pasan al útero y el sistema de

rante 6 horas, se les administra un tranquilizante vía intramuscular, que en este caso es azaperona (Stresnil). Pasados al menos 15 minutos y observando al animal, procedemos a la canulación de una vena marginal de la oreja, donde administramos una combinación de xilacina con ketamina. Con esta anestesia, podemos mantener al animal anestesiado unos 30 a 40 minutos, lo que nos permite realizar la intervención sin problemas.

Una vez dormido el animal, procedemos a su colocación en decúbito su-



°C. El lavado del oviducto, se realiza dos veces, recogiendo cada lavado en una placa diferente.

A continuación se extrae la cánula del oviducto y se realiza la misma operación en el otro oviducto para posteriormente, una vez realizados los dos lavados, proceder a la reubicación del útero en la zona abdominal y suturar los diferentes planos anatómicos. En primer lugar, se realiza una sutura continua del peritoneo, junto con el plano muscular, para lo que utilizaremos catgut del número 2 (**Foto 11**) y una segunda sutura con el mismo material, de la capa muscular subcutánea. Por último, la piel y el tejido subcutáneo, con seda del número 2, dando puntos simples, previniendo el posible roce con el suelo.

Una vez que tenemos las cuatro placas de Petri a 37 °C (**Foto 12**), procedemos a la localización de los embriones, con ayuda de un microscopio estereoscópico o lupa. Hay que tener en cuenta, que al lavar el oviducto, se arrastran muchas células de descamación y el campo suele ser sucio. La ventaja de los embriones de porcino, es que tienen una buena capa de lípidos, lo que permite fácilmente su localización (**Foto 13**). En este momento, se

van seleccionando por su estado morfológico y se pasan a otra placa de Petri más pequeña y con un medio de cultivo limpio. Es ahí donde se visualizan a los máximos aumentos, para determinar, en los embriones de una sola célula, si hay espermatozoides en su zona pelúcida, que será lo que nos indique que ha podido haber fecundación.

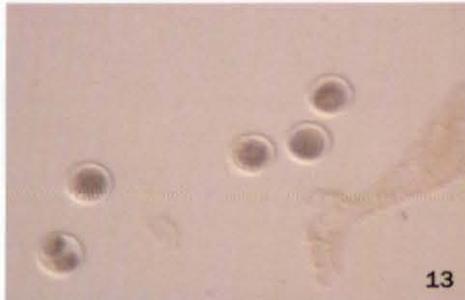
Transferencia

La intervención para realizar la transferencia de los embriones recogidos con anterioridad, procede de la misma forma que la anterior. En este caso, la cerda receptora, como ya hemos indicado anteriormente, suele ser una cerda joven, incluso nulípara, lo que representa unos ovarios pequeños y con pocos puntos de ovulación, pero por lo general suficiente para llevar adelante la gestación de los embriones transferidos. La preparación del animal, anestesia y colocación en la mesa de operaciones, se realiza de la misma manera que para la donante. La incisión es en el mismo lugar, es decir, por laparotomía a la altura del último par de mamas (**Foto 14**). Una vez localizado el ovario, se comprueba el efecto de la gona-

dotropina coriónica y se observan los puntos de ovulación (**Foto 15**). Esto es importante, ya que de no haber habido ovulación, no se formarán los cuerpos lúteos y no se podrá utilizar esa cerda como receptora.

A continuación, se localiza la fimbria (**Foto 16**) y el punto de abertura del oviducto. Mientras tanto, los embriones seleccionados, se recogen directamente de la placa de Petri, con ayuda de una cánula fijada en una jeringa de insulina. Una vez recogidos, esta cánula, se introduce por el oviducto desde la fimbria, unos 8 cm (**Foto 17**) y se depositan con ayuda de la jeringa (**Foto 18**). Se comprueba en la lupa que no ha quedado ningún embrión en la cánula y a continuación se procede a la sutura, de igual forma que con la donante.

Con esta técnica, se puede realizar la transferencia de los embriones *in situ*, de forma sencilla, sin abordar en exceso el aparato genital de la cerda, pudiendo una misma donante, ser utilizada hasta 4 ó 5 veces, dependiendo mucho, de la limpieza con que se lleva a cabo la intervención, para no provocar adherencias. Los resultados obtenidos hasta ahora son muy prometedores, con un 60% de cerdas receptoras



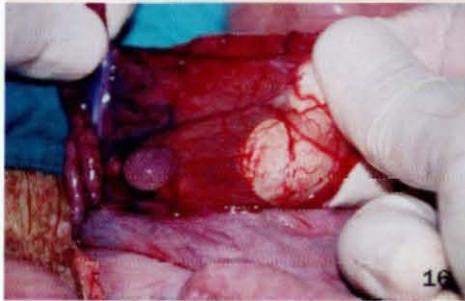
13



14



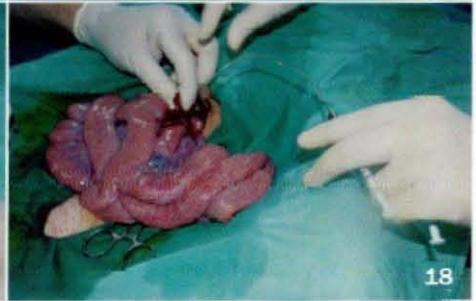
15



16



17



18

paridas. Igualmente, con los medios de cultivo actuales, se pueden trasladar los embriones a otro lugar alejado del punto de obtención de los mismos, y teniendo al grupo de receptoras preparado para la transferencia, llevarla a cabo, tal y como se ha descrito.

Otros procedimientos

Como hemos comentado anteriormente, pueden recogerse los embriones del útero. En este caso, se recogen en estadios de mórula a blastocisto, siendo más resistentes, lo que supone un mayor potencial para obtener mejores resultados. En la actualidad hay distintos grupos de investigación trabajando en técnicas de obtención por medio de laparoscopia (Brüssow, K.P. comunicación personal).

En cuanto al almacenamiento de los embriones, hay muy pobres resultados en la congelación de los embriones de porcino. Si bien puede ser la capa de lípidos la responsable de estos malos resultados, se ha trabajado eliminando esta capa y posteriormente transfiriendo los embriones, pero solo puede llevarse a cabo en casos muy particulares, como con embriones

transgénicos, ya que no es fácil tener los medios para realizarlo, ni compensaría económicamente si se piensa en la aplicación de esta técnica.

En los últimos años se ha descrito una nueva tecnología de congelación, llamada vitrificación (Berthelot *et al*, 2003). Básicamente, consiste en introducir a los embriones en un medio con una alta concentración de crioprotector, durante unos minutos, recoger los embriones con una cantidad mínima de líquido en una pajuela muy fina e introducirlos lo más rápidamente posible en nitrógeno líquido. Debido a la alta velocidad de enfriamiento y a la alta concentración de crioprotector, los embriones no se dañan por los cristales de hielo. Hasta el momento hay muy pocos resultados con esta tecnología, que sin duda hay que seguir investigando.

En cuando a la propia transferencia de los embriones, además de por vía quirúrgica, depositándolos en el oviducto o en el útero, según el estado de desarrollo, puede evitarse la cirugía completa, realizándose por laparoscopia. Igualmente se están desarrollando diferentes sistemas para poder depositar los embriones por vía vaginal, sin necesidad de anestesiarse a la cerda re-

ceptora. El inconveniente en este caso, es que los embriones hay que depositarlos en el primer tercio del útero, lo cual significa atravesar cerca de un metro de longitud del cuerno uterino. En este caso también significaría que la cerda tiene el cervix cerrado y es necesario un gran esfuerzo, atravesarlo para posteriormente profundizar hasta el punto más idóneo.

Esto deja abierta la puerta a la investigación de nuevos métodos, para adaptar esta técnica a las necesidades de la producción porcina actual, estando seguro que antes o después, empezará a utilizarse, permitiendo el transporte de embriones entre países, abaratando costes y mejorando el potencial genético de forma más rápida y segura.

Bibliografía

- Berthelot, F.; Martinat-Botté, F.; Vajta, G.; Terqui, M. (2003). Cryopreservation of porcine embryos: state of the art. *Livestock Production Science*, 83: 73-83.
- Hazeleger, W.; Noordhuizen, J.T.P.M. and Kemp, B. (2000). Effect of asynchronous non-surgical transfer of porcine embryos on pregnancy rate and embryonic survival. *Livestock Production Science* 64:281-284.
- Stroband, H.W.J. and Van der Lende, T. (1999). Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 40: 261-277.