

# Efecto de la superovulación de cerdas multíparas DanBred, Duroc y Pietrain con eCG y hCG sobre la respuesta ovárica y el desarrollo embrionario preimplantacional

La segunda parte de este artículo, publicado en la 9ª edición de la revista digital ReproPig, evalúa el efecto del tratamiento de superovulación y la eficacia de este protocolo en las diferentes líneas genéticas utilizadas.

**Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Martínez CA, Roca J, Martínez EA**

Dpto. Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. 30100 Campus de Espinardo, Murcia

Imagen cedida por los autores

Haz click aquí para escuchar la versión podcast de Cristina Cuello



## Introducción

La transferencia de embriones (TE) es una tecnología que ofrece grandes ventajas productivas y económicas al sector porcino. La TE permite el intercambio de material genético con un riesgo mínimo de transmisión de enfermedades y con un coste reducido con respecto al comercio de animales. Además, la TE evita los problemas de bienestar animal asociados al transporte (Martínez *et al.*, 2019). A pesar de sus importantes aplicaciones, su uso a nivel comercial en porcino es insignificante si la comparamos con el ganado vacuno, donde la TE se aplica de forma rutinaria en los sistemas de producción y mejora genética (Rodríguez-Martínez, 2012). Hace más de 65 años, los rusos Kvasnicki y Novoje obtuvieron las primeras camadas mediante TE de embriones porcinos (Kvasnicki, 2001). Desde entonces, el desarrollo de la TE en porcino ha estado limitado por la necesidad de emplear procedimientos quirúrgicos, tanto para la obtención como para la transferencia de embriones, debido a la especial anatomía del tracto genital de la cerda.



Billion Photos/shutterstock.com

Otro de los grandes obstáculos para la aplicación de la TE porcinos ha sido la dificultad para criopreservar los embriones en esta especie.

A pesar de todas estas dificultades, durante la última década se han realizado importantes avances con relación a los sistemas de TE (Martínez *et al.*, 2001) y a la vitrificación de embriones porcinos (Cuello *et al.*, 2007, 2008), que hacen que la aplicación comercial de la TE en el ganado porcino pueda ser pronto una realidad.

Hace un par de décadas, el grupo de investigación de los autores comenzó a desarrollar un sistema de TE vía no quirúrgica que permite depositar los embriones en el interior del cuerno uterino de cerdas nulíparas y múltiparas (Martinez *et al.*, 2001). Desde entonces, se han estudiado numerosos aspectos relacionados con el desarrollo, seguridad y eficiencia del procedimiento (Martinez *et al.*, 2016; Martinez *et al.*, 2013; Martinez *et al.*, 2016). Gracias a la mejora y desarrollo de este sistema, actualmente se obtienen muy buenos resultados después de la transferencia no quirúrgica de mórulas y blastocistos frescos o almacenados en estado líquido durante 24 h (80-90 % tasa de partos y un tamaño de camada de 9,0-9,5 lechones) así como de embriones vitrificados (50-75 % de tasa de partos y un tamaño de camada de 9.0-10 lechones) (Cuello *et al.*, 2016; Martinez *et al.*, 2015; Martinez *et al.*, 2014).

Uno de los aspectos que se han investigado con el fin de desarrollar un sistema de TE no quirúrgico seguro, práctico y eficiente para la industria porcina es el protocolo de superovulación de las donantes. El número aceptable de embriones frescos para emplear el sistema de transferencia no quirúrgico se sitúa entre 24 y 30 embriones (Martinez *et al.*, 2004), este número aumenta hasta 30-40 cuando se emplean embriones vitrificados (Martinez *et al.*, 2015). Aunque la tasa de ovulación de la cerda es de 15-25 embriones, diversos factores hacen que la proporción donante:receptora se sitúe en torno a 2:1 cuando trabajamos con embriones frescos. La reducción de esta ratio reduciría significativamente el precio del embrión transferible, facilitando así la aplicación comercial de esta tecnología.



El grupo de los autores investigó la eficacia de diferentes protocolos de superovulación en cerdas Duroc múltiparas (Angel *et al.*, 2014). Este estudio mostró que 1.000 UI de eCG administradas 24 h postdestete seguidas de 750 UI de hCG al inicio del estro, incrementaban el número de embriones transferibles y, a diferencia de estudios anteriores (Holtz y Schlieper, 1991), la incidencia de quistes foliculares, la calidad de los embriones o el número de ovocitos no fecundados no se vieron afectados por el tratamiento.

### ¿Qué ocurre en otras razas o líneas genéticas?

Un aspecto interesante del tratamiento de superovulación es saber si es igual de efectivo en otras razas o líneas genéticas, y si en otras líneas afecta o no la calidad de los embriones obtenidos o la incidencia de quistes. Por ello, este mismo grupo mapeó este estudio con el objetivo de evaluar la efectividad del protocolo de superovulación con 1.000 UI de eCG y 750 UI de hCG para mejorar la eficiencia reproductiva como donantes de embriones de cerdas híbridas DanBred, pura raza Duroc y pura raza Pietrain.



**Con este tratamiento de superovulación se consiguió reducir la ratio donante:receptora hasta 1,4:1 en cerdas de raza Duroc.**

## DetECCIÓN DEL ESTRO Y SUPEROVULACIÓN DE LAS CERDAS DONANTES

En este estudio se utilizan como donantes de embriones cerdas destetadas multiparas de 2 a 6 partos de diferentes líneas genéticas DanBred (Landrace×Large-White), Duroc y Pietrain. Las donantes se alojaron en jaulas individuales en instalaciones con ventilación mecánica, alimentadas con una ración comercial dos veces al día y con agua disponible *ad libitum*. La sincronización del estro se realizó durante el destete y únicamente se incluyeron en el estudio cerdas que mostraron un intervalo destete-estros de 3 a 4 días. La superovulación de las donantes se realizó con el protocolo previamente probado por el grupo de investigación (Angel *et al.*, 2014) que consiste en la administración de 1.000 UI eCG (Folligon; Intervet International B.V., Boxmeer, Países Bajos) 24 h después del destete y 750 UI de hCG (Veterin Corion, Divasa Farmavic SA, Barcelona, España) en el momento del inicio del estro. La administración de las hormonas fue vía intramuscular y se realizó mediante una inyección en la cara interior del muslo (músculo gracilis).

La detección del celo se realizó a partir del primer día posdestete permitiendo el contacto hocico con hocico de las cerdas con un verraco maduro vasectomizado. Aquellas cerdas que mostraron reflejo de inmovilidad en presencia del verraco al ejercer presión sobre su lomo fueron consideradas en estro. Las donantes de embriones se inseminaron poscervicalmente a las 0, 24 y 36 h después del inicio del estro con semen de verracos maduros (2-3 años de edad) de fertilidad probada y de la misma línea genética que las donantes. La fracción rica de los eyaculados se diluyó con Beltsville Thawing Solution (BTS) (Pursel y Johnson, 1975).

**Las dosis de inseminación artificial contenían  $1,5 \times 10^9$  espermatozoides en un volumen de 45 ml y se almacenaron a 18 °C durante un periodo máximo de 48 h.**

## Evaluación de los parámetros reproductivos y desarrollo embrionario preimplantacional

En el día 6 de gestación (Día 0 = inicio del estro) se procedió a realizar la recogida de los embriones de las donantes vía quirúrgica siguiendo el protocolo descrito por Martínez *et al.* (Martínez *et al.*, 2014). Durante las

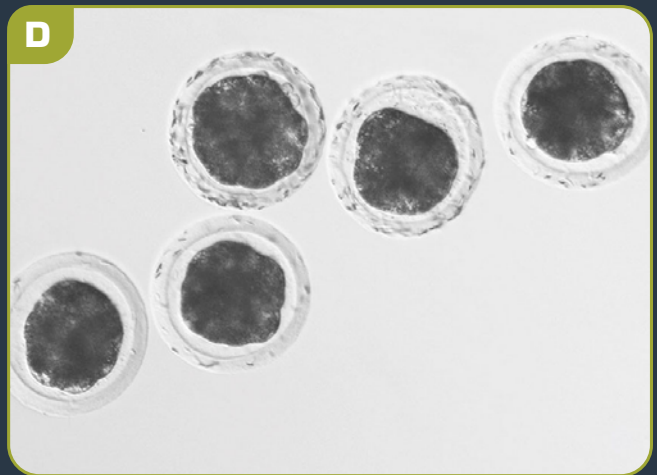
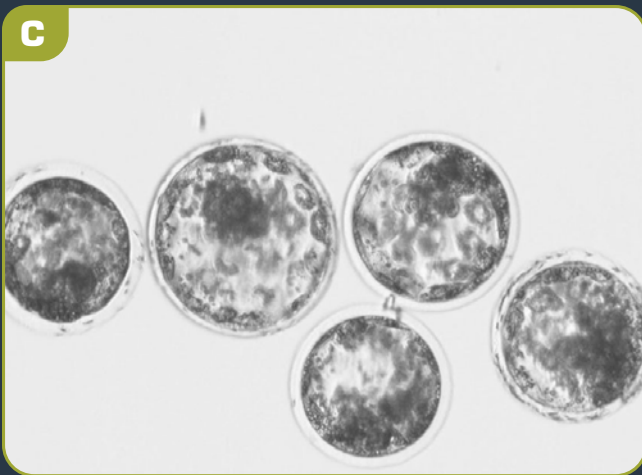


krumanop/shutterstock.com

cirugías se contaron los cuerpos lúteos presentes en los ovarios. Además, se evaluó la presencia de quistes foliculares (estructuras ováricas llenas de líquido transparente sin signos de ovulación y con un diámetro superior a 2 cm en el momento de la laparotomía) en los ovarios (ver figura). Los embriones recogidos mediante el lavado de ambos cuernos uterinos se evaluaron con ayuda de un estereomicroscopio y se procedió a su clasificación según los criterios de la Sociedad Internacional para la Transferencia de Embriones (IETS, por sus siglas en inglés) en función de su estadio de desarrollo y calidad (Wright, 1998).

En este estudio se utilizaron un total de 20 cerdas de cada una de las líneas genéticas evaluadas, DanBred, Duroc y Pietrain. Dentro de cada una de las líneas, 10 donantes se superovularon y 10 donantes se utilizaron como grupo control (sin tratamiento de superovulación). Todas las cerdas se inseminaron de la misma manera y se sometieron a una laparotomía en el día 6 de gestación para recoger los embriones. La tasa de ovulación se calculó teniendo en cuenta el número medio de cuerpos lúteos presentes en los ovarios (ver figura). La efectividad del tratamiento de superovulación en las cerdas donantes se determinó en función del número total de embriones viables recogidos, el número de embriones degenerados y/o ovocitos no fecundados y el número de quistes foliculares.

La tasa de recuperación se definió como el número de estructuras recuperadas con respecto al número total de cuerpos lúteos.



A: Cuerpos lúteos en día 6 de gestación; B: Quiste folicular; C: Embriones en estadio de blastocisto; D: Embriones en estadio de mórula.

### Selección de los embriones

Aquellos embriones en estadio de mórula o blastocisto en día 6 de grado 1 y 2 (excelente y buena calidad, respectivamente) se clasificaron como embriones viables. El resto de las estructuras recogidas, incluyendo embriones poco desarrollados y/o de mala calidad y ovocitos se consideraron embriones degenerados y ovocitos no fecundados, respectivamente.

Los resultados se expresan en medias  $\pm$  SEM. Los porcentajes se evaluaron con el test exacto de Fisher. Las variables continuas se evaluaron con el test de Kolmogorov–Smirnov para determinar la normalidad y se compararon con un ANOVA. El test Post hoc fue el test de Bonferroni. El coeficiente de correlación de Pearson se empleó para evaluar las asociaciones entre el número de cuerpos lúteos y otras variables continuas (embriones viables, embriones degenerados u ovocitos no fecundados o número de quistes). Las diferencias se consideraron significativas para  $P < 0,05$ .

## Respuesta al tratamiento de superovulación

En la *tabla 1* se representan los parámetros reproductivos obtenidos en las cerdas control y las cerdas superovuladas en este estudio. Todas las donantes empleadas quedaron gestantes. En los tres grupos de donantes se observó una correlación significativa ( $P < 0,05$ ) entre el número de cuerpos lúteos y el número de embriones viables recogidos. Sin embargo, no se observó correlación entre el número de cuerpos lúteos y el número de embriones degenerados y/o ovocitos no fecundados obtenidos.

La tasa de recuperación fue muy elevada y similar en los tres grupos de donantes (rango: de  $88,0 \pm 4,7$  a  $93,9 \pm 3,4$  %). El tratamiento de superovulación no incrementó la incidencia de quistes foliculares (rango: de  $0,2 \pm 0,1$  a  $0,9 \pm 0,5$ ), ni el número de embriones degenerados y/o ovocitos no fecundados (rango:  $0,0 \pm 0,0$  a  $2,2 \pm 1,3$ ). Por el contrario, el número de cuerpos lúteos y de embriones viables recogidos fue mayor ( $P < 0,05$ ) en las donantes superovuladas que en las donantes control. Las cerdas DanBred superovuladas mostraron el mayor ( $P < 0,05$ ) número de cuerpos lúteos ( $37,7 \pm 2,0$ ) y embriones viables ( $31,6 \pm 2,2$ ), mientras que las cerdas Pietrain mostraron mayor ( $P < 0,05$ ) número de cuerpos lúteos ( $28,3 \pm 4,5$ ) y embriones viables ( $26,3 \pm 2,6$ ) que las



cerdas Duroc ( $23,5 \pm 1,0$  y  $21,5 \pm 1,2$ , respectivamente). Sin embargo, el incremento total de cuerpos lúteos de las cerdas superovuladas con respecto a las cerdas control fue similar para las donantes DanBred y Pietrain ( $12,3 \pm 1,9$  y  $10,5 \pm 2,3$ , respectivamente) y superior ( $P < 0,05$ ) al observado en las donantes de raza Duroc ( $3,1 \pm 1,0$ ).

	DanBred		Duroc		Pietrain	
	Control	Superov.	Control	Superov.	Control	Superov.
<b>Cerdas gestantes, N</b>	10	10	10	10	10	10
<b>Cuerpos Lúteos</b>	$25,4 \pm 1,6^a$	$37,7 \pm 2,0^{b*}$	$20,4 \pm 0,7^a$	$23,5 \pm 1,0^{b*}$	$17,8 \pm 1,0^a$	$28,3 \pm 4,5^{b*}$
<b>Quistes</b>	$0,2 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,4$
<b>Embriones viables</b>	$24,0 \pm 1,9^a$	$31,6 \pm 2,2^b$	$17,3 \pm 1,1^a$	$21,5 \pm 1,2^b$	$15,6 \pm 1,1^a$	$26,3 \pm 4,6^b$
<b>Embriones degenerados/ ovocitos</b>	$0,0 \pm 0,0$	$2,2 \pm 1,3$	$0,5 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,3$
<b>Tasa de recuperación (%)</b>	$93,9 \pm 2,6$	$89,9 \pm 2,1$	$88,0 \pm 4,7$	$91,6 \pm 2,4$	$89,5 \pm 3,2$	$93,9 \pm 3,4$

Control: Cerdas sin superovular; Superv.: Cerdas superovuladas tratadas con 1.000 UI de eCG y 750 UI de hCG. Los datos están expresados en medias  $\pm$  SEM. Diferentes superíndices dentro de la misma raza indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 1.** Parámetros reproductivos obtenidos en cerdas superovuladas y sin superovular de razas DanBred, Duroc y Pietrain en día 6 de gestación.

## Estos resultados muestran:

1

Que la respuesta al tratamiento de superovulación fue diferente entre razas, siendo las cerdas de la línea DanBred las que mostraron una respuesta más pronunciada al tratamiento.

2

Que la ratio donante:receptora se pudo reducir en todos los casos con el tratamiento de superovulación (*tabla 2*), lo que supone una gran ventaja para la aplicación de la TE y un importante beneficio para las compañías de genética.

Raza	Cerdas control	Cerdas superovuladas
DanBred	1,2:1	0,9:1
Duroc	1,7:1	1,4:1
Pietrain	1,9:1	1,1:1

**Tabla 2.** Reducción de la ratio donante:receptora que se consiguió mediante el tratamiento de superovulación con 1.000 UI de eCG y 750 UI de hCG en cerdas DanBred, Duroc y Pietrain con respecto a las cerdas control no tratadas para transferencias no quirúrgicas realizadas con 30 embriones.

## Conclusión

Estos resultados demuestran que el tratamiento de superovulación con eCG-hCG utilizado incrementó la eficiencia de la producción *in vivo* y recogida de embriones en cerdas destetadas DanBred, Pietrain y Duroc, sin afectar a la formación de quistes ni al número de embriones degenerados y/o ovocitos no fecundados obtenidos. Además, los resultados demuestran que, aunque la superovulación fue efectiva en los tres grupos de donantes, la respuesta al tratamiento fue diferente según la línea genética.

## Bibliografía

- Angel, M. A., Gil, M. A., Cuello, C., Sanchez-Osorio, J., Gomis, J., Parrilla, I., Vila, J., Colina, I., Diaz, M., Reixach, J., Vazquez, J. L., Vazquez, J. M., Roca, J., & Martinez, E. A. (2014a). The effects of superovulation of donor sows on ovarian response and embryo development after nonsurgical deep-uterine embryo transfer. *Theriogenology*, 81(6), 832–839. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.017>
- Angel, M. A., Gil, M. A., Cuello, C., Sanchez-Osorio, J., Gomis, J., Parrilla, I., Vila, J., Colina, I., Diaz, M., Reixach, J., Vazquez, J. L., Vazquez, J. M., Roca, J., & Martinez, E. A. (2014b). The effects of superovulation of donor sows on ovarian response and embryo development after nonsurgical deep-uterine embryo transfer. *Theriogenology*, 81(6), 832–839. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.017>
- Cuello, C., Gil, M. A. A., Almiñana, C., Sanchez-Osorio, J., Parrilla, I., Caballero, I., Vazquez, J. M. M., Roca, J., Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E. A. A., H, R.-M., & Martinez, E. A. A. (2007). Vitrification of in vitro cultured porcine two-to-four cell embryos. *Theriogenology*, 68(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.039>
- Cuello, C., Sanchez-Osorio, J., Almiñana, C., Gil, M. A. A., Peral, M. L. L., Lucas, X., Roca, J., Vazquez, J. M. M., & Martinez, E. A. A. (2008). Effect of the cryoprotectant concentration on the in vitro embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Cryobiology*, 56(3), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.02.005>
- Cuello, Cristina, Martinez, C. A. C. A., Nohalez, A., Parrilla, I., Roca, J., Gil, M. A. M. A., & Martinez, E. A. E. A. (2016). Effective vitrification and warming of porcine embryos using a pH-stable, chemically defined medium. *Scientific Reports*, 6(March), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep33915>

- Holtz, W., & Schlieper, B. (1991). Unsatisfactory results with the transfer of embryos from gilts superovulated with PMSG and hCG. *Theriogenology*, 35(6), 1237–1249. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90369-O](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90369-O)
- Kvasnickii, A. (2001). Research on interbreed ova transplantation. *Theriogenology* 56, 56, 1285–1289.
- Martínez, E. A. E. A., Angel, M. A. M. A., Cuello, C., Sanchez-Osorio, J., Gomis, J., Parrilla, I., Vila, J., Colina, I., Diaz, M., Reixach, J., Vazquez, J. M. J. M. J. L. J. M. J. L. J. L., Vazquez, J. M. J. M. J. L. J. M. J. L. J. L., Roca, J., & Gil, M. A. M. A. (2014). Successful non-surgical deep uterine transfer of porcine morulae after 24 hour culture in a chemically defined medium. *PLoS ONE*, 9(8), e104696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104696>
- Martínez, E. A., Nohalez, A., Martínez, C. A., Parrilla, I., Vila, J., Colina, I., Diaz, M., Reixach, J., Vazquez, J. L., Roca, J., Cuello, C., & Gil, M. A. (2016). The Recipients’ Parity Does Not Influence Their Reproductive Performance Following Non-Surgical Deep Uterine Porcine Embryo Transfer. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(1), 123–129. <https://doi.org/10.1111/rda.12654>
- Martínez, E. A., Vazquez, J. L. M., Roca, J., Lucas, X., Gil, M. A., Vazquez, J. L. M., Martínez, Emilio; Vazquez, Juan M; Roca, Jordi; Lucas, Xiomara; Gil, Maria A; Vazquez, J. L., Martínez, E. A., Vazquez, J. L. M., Roca, J., Lucas, X., Gil, M. A., & Vazquez, J. L. M. (2001). Deep Intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *Reproduction*, 58, 301–311.
- Martínez, E. A., Vazquez, J. M., Roca, J., Lucas, X., Gil, M. A., & Vazquez, J. L. (2001). Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. In *Reproduction (Cambridge, England) Supplement (Vol. 58, pp. 301–311)*.
- Martínez, E.A., Cuello, C., Parrilla, I., Rodríguez-Martínez, H., Roca, J., Vazquez, J. L., Vazquez, J. M., & Gil, M. A. (2013). Design, development, and application of a non-surgical deep uterine embryo transfer technique in pigs. *Animal Frontiers*, 3(4). <https://doi.org/10.2527/af.2013-0032>
- Martínez, E.A., Martínez, C. A., Cambra, J. M., Maside, C., Lucas, X., Vazquez, J. L., Vazquez, J. M., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Gil, M. A., Parrilla, I., & Cuello, C. (2019). Achievements and future perspectives of embryo transfer technology in pigs. *Reproduction in Domestic Animals*, 54, 4–13. <https://doi.org/10.1111/rda.13465>
- Martínez, E.A., Martínez, C. A., Nohalez, A., Sanchez-Osorio, J., Vazquez, J. M., Roca, J., Parrilla, I., Gil, M. A., & Cuello, C. (2015). Nonsurgical deep uterine transfer of vitrified, in vivo-derived, porcine embryos is as effective as the default surgical approach. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep10587>
- Martínez EA, Gil MA, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gomis J, Parrilla I, et al. (2013). Current progress in non-surgical embryo transfer with freshand vitrified/warmed pig embryos.
- Martínez, Emilio A., Angel, M. A., Cuello, C., Sanchez-Osorio, J., Gomis, J., Parrilla, I., Vila, J., Colina, I., Diaz, M., Reixach, J., Vazquez, J. L., Vazquez, J. M., Roca, J., & Gil, M. A. (2014). Successful non-surgical deep uterine transfer of porcine morulae after 24 hour culture in a chemically defined medium. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104696>
- Martínez, Emilio A., Cuello, C., Parrilla, I., Martínez, C. A., Nohalez, A., Vazquez, J. L., Vazquez, J. M., Roca, J., & Gil, M. A. (2016). Recent advances toward the practical application of embryo transfer in pigs. *Theriogenology*, 85(1), 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.002>
- Martínez, Emilio A, Caamaño, J. N., Gil, M. A., Rieke, A., McCauley, T. C., Cantley, T. C., Vazquez, J. M., Roca, J., Vazquez, J. L., Didion, B. A., Murphy, C. N., Prather, R. S., & Day, B. N. (2004). Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology*, 61(1), 137–146. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643868>
- Pursel, V. G., & Johnson, L. A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci*, 40(1), 99–102. <https://doi.org/10.2527/jas1975.40199x>
- Rodríguez-Martínez, H. (2012). Assisted Reproductive Techniques for Cattle Breeding in Developing Countries: A Critical Appraisal of Their Value and Limitations. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL. 1), 21–26. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01961.x>
- Wright, J. (1998). Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In D. Strinfellow & S. Siedel (Eds.), *Manual of the International Embryo Transfer Society* (pp. 167–170).