

Producción *in vitro* y transferencia de embriones porcinos: Revisión de Literatura

Oscar Vidal Mancias Andrade

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Producción *in vitro* y transferencia de embriones porcinos: Revisión de Literatura

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Oscar Vidal Mancias Andrade

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2020

Producción *in vitro* y transferencia de embriones porcinos: Revisión de Literatura

Presentado por:

Oscar Vidal Mancias Andrade

Aprobado:



Rogel Castillo, M.Sc.
Asesor Principal



Rogel Castillo, M.Sc.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria



John Hincapié (Nov 4, 2020 09:42 CST)

John Jairo Hincapié, D.Sc.
Asesor



Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Vicepresidente y Decano Académico

Producción *in vitro* y transferencia de embriones porcinos: Revisión de Literatura

Oscar Vidal Mancias Andrade

Resumen. La presente investigación da a conocer el proceso de la producción *in vitro* de embriones y su posterior transferencia de estos en ganado porcino. Esta es una técnica que ha sido investigada por años y actualmente se quiere volver más eficiente por la alta demanda de carne y sus derivados provenientes de esta especie. Además, también se requiere de esta práctica para obtener un buen número de lechones en las camadas ya que los cerdos son de suma importancia para poder realizar xenotrasplantes por la similitud entre este ganado y los seres humanos. Para que este proceso de producción *in vitro* pueda llevarse a cabo hasta la culminación en su transferencia a las madres receptoras incluye diversos pasos. Se debe considerar las características de ambos padres ya que su descendencia se verá influenciada por ellos. Se trabaja con gametos femeninos (ovocitos) y gametos masculinos (espermatozoides). La calidad de las células afecta el origen de los embriones y su posterior desarrollo. Existen diferentes parámetros a tomar en cuenta para evaluar la calidad de las células espermáticas, así como también los ovocitos. Para la maduración y fertilización *in vitro* se implementan diferentes medios para el desarrollo óptimo de los gametos y de los embriones. Los medios a utilizar varían de acuerdo con la etapa del procedimiento. Al culminar este proceso se prosigue a la transferencia de los embriones obtenidos, en la madre receptora bajo diferentes métodos cada uno con características específicas, así como ventajas y desventajas.

Palabras clave: Fecundación, gametos, maduración, medios.

Abstract. The main purpose of this literature review is presenting the process of *in vitro* embryo production and their transfer in pigs. This technique has been studied for years and its current goal is increasing efficiency because of the markets' demand for meat and derivatives of such organism. Besides, with the use of this practice, a bigger litter can be achieved, and they are required for xenotransplantation because of the similarity between pigs and human beings. Several steps need to be followed in order to complete the *in vitro* production process ending in the embryo transfer in the receiving female. Both, male and female donors' characteristics have to be considered because they will affect their descendants. This process works with female gametes (oocytes) and male gametes (sperms). The cells' quality affects the origin of embryos and their development. Several parameters have to be considered in order to evaluate spermatic cells as well as oocytes. Different media are used for *in vitro* maturation and fertilization; this is for gametes and embryos to have an optimum development. Media used depends on the stage of the process. Once *in vitro* production is done, embryo transfer takes place in the receiving swine. This transfer can be done under different methods and each has its own characteristics as well as advantages and disadvantages.

Key words: Fertilization, gametes, maturation, media.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Índice General	iv
Índice de Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. GENERALIDADES.....	3
3. SELECCIÓN DE PADRES.....	4
4. RECOLECCIÓN DE GAMETOS.....	5
5. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>IN VITRO</i>.....	7
6. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	15
7. CONCLUSIÓN.....	17
8. RECOMENDACIONES.....	18
9. LITERATURA CITADA	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Cámara de Neubauer para conteo de células espermáticas	11
2. Espectrofotómetro	11
3. Anomalías en gametos masculinos	12
4. Transferencia no quirúrgica (TnQ) en cerdas	15
5. Procedimiento de transferencia de embriones no quirúrgica en cerdas	16

1. INTRODUCCIÓN

La carne porcina es la que más se consume, representando el 36.5% de consumo total de carne a nivel mundial (FAO 2020). Este antecedente da información acerca de la necesidad de producción de carne de este ganado para sustentar y proveer la demanda del mercado.

Con la alta necesidad de este producto no solo con fines comerciales de consumo, sino que dado la similitud del cerdo con el ser humano en características como: anatomía, dieta, respuestas fisiológicas y fisiopatológicas y dado la escasez de donadores de órganos, sin duda éstos se han convertido en esenciales en los xenotrasplantes (Marinone *et al.* 2018). Estos avances en las diferentes ciencias han sumado importancia a la implementación de nuevas técnicas y procedimientos para volver más eficiente la producción de porcinos y sus derivados en términos de tiempo, cantidad y calidad.

A través del tiempo el hombre ha trabajado buscando reproducir artificialmente los eventos de la maduración, fertilización ovocitaria, y el desarrollo embrionario temprano (Mucci *et al.* 2006), desarrollando e implementando diversas técnicas para poder cumplir con los altos requerimientos de demanda.

Algunas de estas técnicas son: el uso de semen sexado, la producción y transferencia de embriones, así como la práctica de la inseminación artificial (IA) la que a su vez puede ser: inseminación artificial estándar o cervical “Standard Artificial Insemination” (SAI), inseminación artificial post cervical “Post Cervical Artificial Insemination” (PCAI), e inseminación artificial intrauterina profunda “Deep Intrauterine Artificial Insemination” (DUI) (Luchetti *et al.* 2017; Martínez Madrid 2002).

El avance tecnológico se ha vuelto una necesidad y el área de ciencias animales no es la excepción, todo cambio e implementación de biotecnología entendida como la aplicación de la ciencia e ingeniería en el uso directo o indirecto de organismos vivos o parte de ellos en sus formas naturales o modificadas (Hernández Fonseca 2010), amerita inversión, no solo en infraestructura, sino en equipo de alta calidad y personal especializado para que dichos procesos y procedimientos se lleven a cabo de manera óptima maximizando la producción y minimizando las pérdidas.

La técnica de producción *in vitro* y transferencia de embriones ha presentado un auge importante, ya que ofrece la posibilidad de obtener embriones a bajo costo para ser utilizados con fines de estudio o propósitos comerciales (Mucci *et al.* 2006). En este último caso permitiría poder suplir la demanda de dicho producto animal de manera más eficaz.

El trabajo da a conocer el proceso de producción de embriones *in vitro* y su posterior transferencia a la madre receptora, sin embargo, para llegar a esta etapa se guiará en un recorrido por la secuencia que se lleva a cabo para el éxito de ambos procesos buscando como resultado la obtención de la viabilidad de los embriones en la madre receptora.

La transferencia de embriones ha generado un interés particular por la mejora del material génico de las crías. La implementación de esta técnica ayuda a la reproducción del ganado porcino,

transfiriendo buena genética de un padre y madre a sus descendientes y un riesgo mínimo de transmisión de enfermedades (Gomis Almendro 2013).

Al momento de iniciar el proceso es importante considerar algunos aspectos de los padres, que van a ser utilizados para poder crear los embriones. El sistema de producción debe analizar características fenotípicas propios de la madre y el padre a seleccionar (Córdova-Izquierdo 2020). Esta consideración del fenotipo de los progenitores es fundamental en las crías ya que la genética se mantendría debida a la selección, permitiendo que las características queden en los lechones que en un futuro pueden volverse madres de reemplazo o donadores de óvulos o de material seminal en machos.

Otra característica para tomar en consideración es la edad, parámetro que no sólo influye en la calidad seminal del verraco sino también en la fertilidad de este (Quintero-Moreno *et al.* 2008). La recolección de gametos es otro de los aspectos determinantes para el éxito de la producción de embriones y su posterior transferencia. Llegando por último a lo que es el epicentro de la revisión temática que consiste en la producción *in vitro* y la transferencia de embriones, definiendo como transferencia o transferir: “pasar o llevar algo de un lugar a otro” (Real Academia Española 2014).

El objetivo de esta investigación es enumerar y describir cada una de las etapas y los diferentes pasos para llevar a cabo la producción *in vitro* de embriones y su posterior transferencia a la hembra receptora. Además, se consideran los parámetros de selección tanto de gametos masculinos como femeninos y los diferentes medios para su desarrollo óptimo. La producción *in vitro* y la transferencia de embriones conlleva en si una serie de etapas de las que se hará una revisión en el contenido temático.

2. GENERALIDADES

La producción de embriones *in vitro* es una técnica que está en auge por muchas razones, sin embargo, en el campo de las ciencias animales (ganado porcino) la importancia radica principalmente en la calidad de la cría obtenida. Esta técnica vuelve más eficiente la reproducción animal ya que la fecundación se realiza en laboratorio bajo estándares orientados a la minimización de riesgo de enfermedades y anomalías congénitas. Para la producción de embriones es necesario seguir un proceso, determinado por una serie de pasos secuenciales que da por resultado la obtención de los embriones *in vitro* y su posterior implantación en la madre receptora. Este proceso está conformado por diferentes pasos, que son:

1. Selección de padres
2. Recolección de gametos
3. Producción *in vitro*
4. Transferencia de embriones

Para lograr una comprensión total del proceso en sí de producción y transferencia de embriones es necesario hacer una revisión previa de dos aspectos que, si bien es cierto no son propios de la técnica en sí, pero son determinantes para el éxito de ambos procesos que serán especificados a continuación.

3. SELECCIÓN DE PADRES

Este es el primer paso para obtener un buen resultado en cuanto a la calidad de los embriones. La selección de las características que se desean en los nuevos organismos es necesaria y para cumplir con estos requerimientos es importante revisar los registros de ambos: padre y madre, para evitar consanguinidad y cualquier discapacidad o característica no deseada, para que los nuevos organismos no presenten dichos defectos.

Hay características de alta, media y baja heredabilidad. Las de baja heredabilidad como lo es la prolificidad es esencial en producción de ganado porcino (Boylan *et al.* 1961).

Del padre donador se necesitan las células espermáticas para poder llevar a cabo la fecundación del óvulo. Es necesario prestar atención en aspectos que pueden influir en la calidad y cantidad de material seminal que se pueda obtener del verraco. Características como: edad, estímulo sexual, raza, estrés y tamaño testicular, influyen en lo mencionado previamente (Valverde-Abarca *et al.* 2018).

Se debe tomar en cuenta las mejores características que posea la hembra donadora y obtener los óvulos de ella y el registro de parientes de la madre también debe considerarse para evitar que las crías posean características que no provean beneficios a la productividad.

4. RECOLECCIÓN DE GAMETOS

Una vez habiendo seleccionado los padres se procede a la recolección de gametos (óvulos y espermatozoides).

Recolección de óvulos

Un óvulo es un gameto que lleva la información genética de la madre donadora. Esta parte del proceso es primordial ya que es la base para el procesamiento de producción de embriones. Existen dos maneras de obtener el material por parte de la madre donadora, estos son: mediante un método quirúrgico de recolección, o con un método no quirúrgico para obtener los óvulos (Hazeleger y Kemp 2001). Es necesario esperar a que las cerdas presenten al menos su tercer estro para realizar esta actividad ya que en cerdas prepúberes la calidad de los ovocitos es menor (Marinone *et al.* 2018).

Método quirúrgico para obtención de óvulos

Esta técnica ha sido utilizada desde 1960, consiste en realizar una incisión en la parte media ventral del abdomen, se hace la inserción de un tubo delgado y luego se hace el lavado de los cuernos uterinos. Este procedimiento está limitado a realizarse pocas veces (2-3) debido a la formación de la cicatriz y adherencias (Hazeleger y Kemp 2001).

Otra alternativa es obtener los gametos femeninos del tracto reproductor después del sacrificio de la cerda y de dicha manera disminuir los costos (Fernández Reyes *et al.* 2009).

Esta técnica luego se mejoró para disminuir el trauma y se pasó a la endoscopía, mediante la cual se pueden recolectar embriones tanto del oviducto como del útero (Hazeleger y Kemp 2001). Debía desarrollarse una técnica en la cual se disminuyera el trauma al organismo, cumpliendo con los parámetros de bienestar animal y esto dio origen al método no quirúrgico.

Método mínimamente invasivo/no quirúrgico para obtención de óvulos

Este segundo método está en investigación ya que no se puede usar en todas las cerdas, sino únicamente en las que cuenten con cuernos uterinos cortos. Este acortamiento de los cuernos se puede realizar mediante la resección desde la punta de los cuernos hasta la base de estos (cercano de la bifurcación). Una vez realizado este proceso se procede al lavado o “flushing” que es similar al realizado en ganado bovino. Cabe mencionar que no se ha logrado desarrollar un procedimiento no quirúrgico en su totalidad (Hazeleger y Kemp 2001).

Es importante recalcar que los ovocitos deben ser almacenados inmediatamente para evitar su deterioro debido a la concentración de oxígeno, cambios de pH y condiciones lumínicas (Torres-Osorio *et al.* 2019), que podrían afectar la interacción con el espermatozoide al momento que éste quiera fecundar o podría formarse un embrión cuyas probabilidades de desarrollarse se disminuyen.

El estudio de los espermatozoides también es un factor importante porque, aunque se obtengan buenos ovocitos de una hembra donadora, también se debe contar con semen de un verraco que posea características adecuadas para el sistema de producción en el cual se está trabajando; si la calidad de los espermatozoides no es la mejor, entonces ese ovocito se perderá.

5. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO*

La producción *in vitro* (PIV) ha sido de gran interés para la creación de nuevos organismos. Para el procesamiento de producción de embriones es obligatorio mantener las condiciones adecuadas tales como la temperatura y el medio en el cual estos estaban en la madre donadora.

Este proceso está compuesto por: la maduración *in vitro* (MIV), la fecundación *in vitro* (FIV) y el cultivo *in vitro* de embriones (CE), hasta alcanzar el estadio de blastocisto. La polispermia uno de los principales obstáculos al cual se enfrenta la PIV (Martínez Madrid 2002).

Maduración *in vitro* (MIV)

La maduración de los embriones es un proceso en el cual se quiere dar origen a ovocitos con la misma calidad como si fueran *in vivo* (González-Figueroa y González-Molfino 2005), sin embargo, en la actualidad el desarrollo hasta el estadio de blastocisto de los embriones PIV es todavía bajo (Martínez Madrid 2002) con resultados variables según los protocolos y grupos de trabajo (Niemann y Rath 2001) y se da en medios de cultivo específicos para cada etapa de la maduración (Ruiz 2010).

Para mejorar el sistema de MIV se recomienda una buena selección y manipulación de los ovocitos tomando en cuenta los siguientes factores:

1. Condiciones de transporte de los ovocitos al laboratorio: Al incrementarse el tiempo de transporte se reduce la maduración (Martínez Madrid 2002)
2. Tamaño del folículo (Yoon *et al.* 2000)
3. Método de recolección (Fernández Reyes *et al.* 2009; Hazeleger y Kemp 2001; Torres-Osorio *et al.* 2019)

Los medios se mantienen en incubadoras ya que una vez los ovocitos son introducidos en el mismo, se deben mantener en un microclima o ambiente controlado, (osmolaridad, pH, composición iónica del medio, temperatura, tensión de CO₂, O₂, del incubador; volumen de cultivo y tiempo de incubación) (García Roselló 2008; Ruiz 2010).

Estos controles deben realizarse ya que los ovocitos pueden pasar desde horas hasta días bajo estas condiciones y resultar en un buen desarrollo (Ruiz 2010).

En este aspecto son necesarias algunas condiciones de cultivo entre ellas: duración del cultivo durante la MIV (36 a 48 horas), temperatura, atmósfera de cultivo de embriones porcinos (5% de CO₂ y 95% humedad) (Martínez Madrid 2002).

Para la MIV de embriones porcinos se han utilizado diversos medios entre ellos: “Whitten”, KRB “Krebs Ringer Bicarbonato”, NCSU23 “North Carolina State University”, TCM199 “Tissue Culture Medium 199”, “Waymouth” (Martínez Madrid 2002). Sin embargo, en un estudio realizado recientemente, el medio con mejores resultados fue el NCSU-37. A pesar de que la concentración y elementos usados son los mismos (sorbitol, cisteína, glucosa, fluido folicular

porcino o PFF) entre el medio NCSU-23 y NCSU-37, es la presencia de gonadotropinas en este último lo que colabora en la obtención de una mejor tasa de maduración (Pyoos-Daniels *et al.* 2019). Cabe mencionar que la concentración recomendada de PFF es el 10% de la dosis total (Martínez Madrid 2002). La suplementación con PFF mejora la maduración sin embargo se considera una molécula no caracterizada y es por esto que se podría hacer uso de LH y FSH en los medios que llevaría la maduración *in vitro* hasta un 82% (Ducolomb Ramírez *et al.* 2005).

El medio de cultivo debe ser lo más parecido al fluido oviductal (FO) brindando los elementos necesarios para la maduración. El medio de cultivo y el FO se diferencian en las concentraciones que se utilizan y también en las combinaciones de elementos que se hacen (Romar 2001). Se observó que el enriquecimiento de los medios de cultivo con suplemento de tipo fluido folicular porcino (PFF), que es el fluido fisiológico que llena el antro folicular y baña al ovocito en condiciones *in vivo*, está compuesto básicamente por hormonas esteroideas (principalmente estrógenos), gonadotropinas, factores de crecimiento, proteínas plasmáticas, enzimas, entre otros factores aumentando el porcentaje de maduración (García Roselló 2008; Martínez Madrid 2002).

Otros suplementos utilizados en los medios para la MIV son: suero fetal bovino (FCS), albúmina sérica bovina (BSA), glutatión (GSH), Cisteína (Cys), Gonadotropinas, factor de crecimiento epidérmico (EGF) (García Roselló 2008).

Fecundación *in vitro* (FIV)

La FIV es el estudio de la penetración de una célula espermática a un ovocito y la conservación de material genético (Gadea Mateos *et al.* 1998), fuera del tracto genital (García Roselló 2008). El ovocito debe contar con una estructura intacta y fisiología normal (Gadea 2001).

Esta parte del proceso que lleva al desarrollo de embriones ayuda a medir la capacidad de las células espermáticas de poder fecundar el óvulo, es decir, mediante este paso se mide la calidad del material seminal, que a su vez da información acerca del verraco donante (Córdova Izquierdo 2002). Cabe mencionar que la duración de esta etapa es de 52 horas (Muñoz Valdéz 2005).

La conservación de gametos no debe excederse ni ser menor a tres horas, ya que al sobrepasarse de este tiempo aumenta la posibilidad que ocurra una polispermia, mientras que la conservación de los gametos por un menor tiempo no presenta una mejora en tasas de penetración y polispermia. Por ende, el uso de tres horas en la incubación de gametos tanto masculinos como femeninos es el óptimo (Marinone *et al.* 2018).

Con respecto a los ovocitos, se recomienda que se incuben ya sea en 10% o 30% en fluido oviductal porcino (FO) para aumentar la monospermia sin afectar la tasa de penetración de espermatozoides. Además, previo a iniciar la FIV, los espermatozoides se deben centrifugar para separarlos del plasma seminal. Así como también se debe suplementar calcio extracelular (Ca^{++}) al medio (cuyo rango o concentración se encuentra bajo estudio) para el desarrollo y cumplimiento de la reacción acrosomal y la capacitación espermática (Marinone *et al.* 2018).

Los medios más recomendados para FIV son TBMm y TALPm. La m significa modificado ya que ambos fueron suplementados con BSA y cafeína. Cabe mencionar que el TBMm debe prepararse un día previo a su uso para el equilibrio del pH (Martínez Madrid 2002). Ambos medios comparten

elementos como cloruro de sodio y de potasio, piruvato de sodio, glucosa, cafeína y BSA. A pesar de tener los mismos elementos, las concentraciones varían (Coy *et al.* 2002). Es importante saber que si dichos medios son suplementados con LH y FSH se podría alcanzar un 70% de los ovocitos fecundados (Ducolomb Ramírez *et al.* 2005). Las etapas y consideraciones para llevar a cabo una buena FIV serán definidos a continuación:

Preparación de las células espermáticas para fecundación

En esta etapa se deben tomar en cuenta las características macroscópicas y microscópicas del material seminal. Para la evaluación macroscópica no se requiere ningún equipo especial, pero si amerita a una persona capacitada y experimentada en este campo, estudios refieren que la evaluación macroscópica no sólo comprende la identificación de las fracciones seminales sino también el volumen y color del semen, sin embargo, algunos otros incluyen en esta evaluación macroscópica el olor, la consistencia, limpieza o pureza y el pH de la eyaculación obtenida (Córdova Izquierdo 2020; Romar 2001).

Es importante sumar a este análisis superficial, el de las características microscópicas ya que en estas se define la capacidad del espermatozoide para realizar la fertilización, dentro de dichas características se incluyen: concentración, morfología, motilidad y viabilidad (Córdova-Izquierdo y Córdova-Jiménez 2007). Con el propósito de profundizar en las características que debe presentar el material seminal, se analizarán una a una:

Valoración macroscópica del semen

Fracciones del material seminal. Existen dos fracciones en el semen: la fracción rica y la fracción pobre. La fracción rica debe su nombre a que contiene la mayor cantidad de células espermáticas, es decir, tiene un alto número de gametos masculinos. Por otro lado, se encuentra la fracción pobre que incluye cierto número de espermatozoides, pero no tan importante como el de la primera fracción.

La eyaculación puede presentarse por ondas o de manera intermitente, por lo general sólo se presenta una única onda, pero hay ocasiones o verracos que pueden presentar más de una. La presencia de más de una onda no tiene efecto alguno ya que el 82% de los espermatozoides se obtienen en la primera onda (Córdova-Izquierdo y Córdova-Jiménez 2007). Terminada la identificación de las fracciones se procede a la evaluación del color y volumen obtenido.

Color y volumen del semen. El volumen puede variar desde 200 hasta 300 mL, con un valor promedio de 250 mL de material seminal en una sola eyaculación. Para poder realizar este análisis, se requiere el uso de herramientas como: bolsas con graduación, probetas o que al menos el recipiente en el cual se realiza la colecta sea graduado. En referencia al volumen del material eyaculado, su valor se utiliza para calcular la concentración espermática. A mayor cantidad de eyaculaciones menor es el volumen que se obtiene, y por ende menor va a ser la cantidad de espermatozoides funcionales (Hernández 1998).

Además, se recomienda que el recipiente de recolección sea transparente ya que es la única forma de poder evaluar la coloración del semen. El color que se espera para poder determinar que es un

buen material debe ser blanco y lechoso (Córdova-Izquierdo y Córdova-Jiménez 2007), si se encuentra alguna otra pigmentación en el semen (tonos marrones, amarillentos, o rojizos) debe considerarse varios factores, entre ellos: que no es de la mejor calidad, que se contaminó (por orina), por condiciones propias del tracto reproductor del macho donador e importante tener en consideración que la coloración también puede variar de acuerdo a la alimentación que recibe el verraco (González 2006).

Es necesario tener presente que hay factores en los que se puede influir ya sea modificándolos o cambiándolos para mejorar la calidad de los espermatozoides, siendo algunos de los más destacados la dieta, ya que existen elementos en ella que pueden mejorar la calidad, pero a la vez puede haber elementos en exceso como el Selenio (Se) que al ser excretados por el verraco pueden ser contaminantes para el medio ambiente, interfiriendo en la viabilidad de la célula espermática e incluso llevar a una degeneración testicular (Latorre Gorriz 2006).

Sin embargo, se reportó que cerdos con dietas bajas en Selenio presentaban espacios entre la cola y la membrana plasmática del espermatozoide, dificultando el movimiento (Salazar 2017).

Olor. Es una característica que no requiere de ningún tipo de equipo. La persona encargada de cumplir con esta práctica debe contar con experiencia ya que su única herramienta es el sentido del olfato. Cualquier olor ajeno al propio de la eyaculación del verraco, fétido, extraño o inodoro presenta una desventaja ya que se puede dar por condiciones inadecuadas en los testículos. Es de mencionar que el olor a orina tampoco debe presentarse ya que de ser así es porque se realizó una mala práctica del colector o el verraco padece de alguna patología (Córdova Izquierdo 2020).

Limpieza y pureza. El material seminal que se obtenga de la colecta debe estar libre de cualquier objeto ajeno al semen. El uso de filtros ayuda a que se evite la contaminación como tierra o basura (Córdova Izquierdo 2020). Para evitar la contaminación de residuos de orina o vellos es necesario recortar y rasurar el prepucio del macho. La viabilidad de los espermatozoides depende del medio en el que se desarrollen y éste, a su vez, debe ser lo más parecido al ambiente dentro del macho, incluyendo el pH.

pH. Otro aspecto que debe considerarse es la acidez que exista en el eyaculado. El pH se considera una evaluación macroscópica ya que no se requiere más que tiras reactivas para determinar su acidez o alcalinidad. En este análisis se permite un rango de 6.8 a 7.4 (Córdova Izquierdo 2020). Una vez hecho el análisis a nivel macroscópico del material seminal se procede al análisis microscópico de la eyaculación.

Evaluación microscópica del semen. La evaluación de este aspecto es importante para determinar la capacidad de los espermatozoides para llegar hasta el gameto femenino, superando las limitaciones que se presenten independientemente del tipo de reproducción que se practique, y realizar la fertilización. Hay cuatro parámetros que deben ser considerados en dicha evaluación que van a ser detallados a continuación.

Concentración de las células espermáticas. Al momento de hablar de la concentración de gametos masculinos se refiere al número de espermatozoides en el volumen colectado de la eyaculación del verraco. El conteo de las células masculinas obtenidas se realiza con el uso de la Cámara de Neubauer (Figura 1), también conocida como hemocitómetro, por ser la más práctica.

Conocer esta información es de suma importancia ya que junto con el dato obtenido del volumen del eyaculado se determina el número de dosis en el cual se puede dividir el material seminal (Córdova-Izquierdo y Córdova-Jiménez 2007). Sin embargo, el uso del método mencionado previamente varía de acuerdo con la experiencia de la persona que realice el conteo y esta variabilidad influye en el resultado que se obtenga, el cual puede disminuir con el uso de un método de conteo automático. Es por esto por lo que se implementó el uso de la espectrofotometría (Figura 2) ya que es más eficiente y la variabilidad es menor (Rodríguez *et al.* 2008). Si se basa en la precisión existe un método manual más eficiente que la espectrofotometría y se realiza con la Cámara de Bürker. Es más preciso en comparación al método automático ya que el espectrofotómetro incluye las células espermáticas muertas y aglutinadas en su conteo (Camino *et al.* 2019). La concentración recomendada de espermatozoides por ovocito es de 10000:1 (Fernández Reyes *et al.* 2010). El número de espermatozoides no importaría si estos no cuentan con la forma (morfología) adecuada porque dificultaría la capacidad y la habilidad de moverse (motilidad) hasta el óvulo que debe ser fecundado.



Figura 1. Cámara de Neubauer para el conteo de células espermáticas (Córdova Izquierdo 2020).



Figura 2. Espectrofotómetro para análisis de concentración de espermatozoides (Grau 2020).

Morfología de los espermatozoides. Morfología se refiere a la forma que van a tener las células espermáticas que existan en el eyaculado. En la eyaculación obtenida no debería haber más de un 10% de espermatozoides con anomalías (Figura 3). Las anomalías pueden presentarse en cabeza, cuello, cola, y estas alteraciones morfológicas están asociadas a infertilidad (Córdova Izquierdo 2020; Hernández 1998).



Figura 3: Anomalías de las células espermáticas (Córdova Izquierdo 2020).

Motilidad individual de los espermatozoides. La motilidad en los espermatozoides es el movimiento de las células espermáticas en el medio que se presentan para poder cumplir su función de realizar, junto con el óvulo, la fertilización y dar origen a un embrión. Hay varias diferencias entre razas de verracos y dentro de las mismas también hay diferencias de macho a macho, pero no se puede confirmar que los organismos que provean células espermáticas con menor motilidad signifiquen que su fertilidad sea menor (Sonderman y Luebbe 2008).

Dentro del tema de este mismo aspecto se evalúa la motilidad progresiva y no progresiva. La motilidad progresiva hace referencia a espermatozoides que cuentan con movimiento de avance rectilíneo, cualquier otro movimiento diferente se considera un movimiento no progresivo.

Debido a esto la motilidad individual progresiva es indicador de la calidad seminal, estableciendo que una motilidad progresiva del 70% se considera un semen de buena calidad (Hernández 1998). Siendo el movimiento progresivo el que se necesita para que la célula espermática llegue hasta el óvulo y lo fecunde. Se debe conocer el número de espermatozoides vivos en lo que se colectó ya que mediante este dato se van a conocer el número de fertilizaciones que podrían lograrse (Hernández 1998).

Viabilidad. Este aspecto se mide posterior al análisis de la motilidad de las células espermáticas ya que la única manera de saber si el espermatozoide va a cumplir su función de fertilizar el óvulo es sabiendo si este tiene buena motilidad. La viabilidad es el número o porcentaje de espermatozoides vivos que existan en el semen colectado. Para calcular la viabilidad se hace uso de colorantes como eosina-negrosina. El aporte de este colorante se hace mediante la coloración de gametos masculinos muertos; por otro lado, las células reproductoras masculinas que se encuentren vivas no se van a teñir. Para determinar la calidad del semen, basándose en este aspecto,

se conoce que el porcentaje de espermatozoides vivos debe estar sobre el 70% (Córdova Izquierdo 2020).

Al igual que en el proceso de MIV, existen también medios utilizados para la FIV entre ellos: TCM199, Medio BO “Brackett and Oliphant medium”, la solución KRBm “Krebs Ringer Bicarbonate modified”, el medio TBM modificado “Tris Buffered medium”, y el medio TALP modificado “Tyrode-Albumin-Lactate-Piruvate medium” (García Roselló 2008; Martínez Madrid 2002).

Cultivo *in vitro* de embriones (CIV)

En los primeros estudios sobre CIV no se logró sobrepasar el estadio cuatro de células, este estadio se prolonga durante 24 horas *in vivo* y es la fase en la que se produce el paso de los embriones porcinos del oviducto al útero (Martínez Madrid 2002). Sin embargo, mediante la aplicación de esta técnica *in vitro* puede prolongarse de seis a siete días para obtención de embriones en estadio de blastocisto (Mucci *et al.* 2006). Esta etapa puede variar entre 13 a 18 horas para evaluar la fecundación y seis días para análisis del desarrollo embrionario (Gomis Almendro 2013).

El medio óptimo para el desarrollo de los embriones es el tracto reproductor de la cerda, sin embargo, estos mismos (embriones) se pueden desarrollar hasta el estadio de blastocisto en otras especies como la oveja.

Con la suplementación de la glutamina (aminoácido) se ha mejorado el desarrollo de los embriones porcinos *in vitro* (Gil Corbalán 2008), pese a esta mejora el desarrollo de los embriones es más lento que en vivo, y dan lugar a un blastocisto con un menor número de células, unido a una progresiva pérdida de la viabilidad (Martínez Madrid 2002).

Debido a esto algunas condiciones de CIV deben tomarse en cuenta:

- a. Tensión de Oxígeno
- b. Relación embriones / volumen medio

Como se hizo mención anteriormente, los medios de cultivo son los encargados (junto con el ambiente controlado) de conservar ya sean los gametos o los embriones hasta que estos sean transferidos a la hembra receptora.

La composición de los medios de cultivos de embriones requiere de:

- a. Fuentes energéticas (Petters *et al.* 1990)
- b. Fuente proteica: Aminoácidos, macromoléculas
- c. Agua
- d. Sales inorgánicas (García-Vásquez y Matás 2001)

El medio de cultivo que ha proporcionado los resultados más favorables es el medio de cigoto porcino (PZM), en cuanto a calidad y cantidad de blastocistos además que no es necesario realizar ningún cambio en el medio para cambio de fase como se debe hacer en el medio Universidad de Carolina del Norte-23 (NCSU-23 por sus siglas en inglés) (Marinone *et al.* 2018).

La prueba definitiva que va a medir la viabilidad embrionaria es el establecimiento de gestaciones y el nacimiento de crías vivas, tras la transferencia a una hembra receptora.

6. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Para que este paso se pueda presentar es necesario recurrir a otras técnicas como: la sincronización de celo tanto de la hembra donadora como la madre receptora y también se debe llevar a cabo una superovulación (Córdova Izquierdo 2002).

Hasta el momento se han utilizado tres tipos de técnica:

1. La transferencia quirúrgica clásica mediante laparotomía e introducción de los embriones en el oviducto o en el cuerno uterino cuyos porcentajes de gestación van desde 17% al 100% y tamaños de camada de 2.4 a 10.8 lechones
2. La técnica de laparoscopia con porcentaje de gestación de 14% al 90% y camadas que oscilan entre siete a nueve lechones
3. Procedimientos no quirúrgicos basados en el abordaje transcervical, tienen la ventaja de no necesitar sedación y son mínimamente invasivos, sin embargo, los porcentajes de gestación va desde 9% al 64% y las camadas de 3.1 a 10.9 lechones (García Roselló 2008).

Actualmente, se está practicando la transferencia no quirúrgica de embriones (TnQ) (Figuras 4 y 5) que consiste en la deposición de los embriones mediante un catéter atravesando el cérvix, alcanzando la profundidad del cuerno uterino en poco tiempo (3-5 minutos) en la mayor parte de las cerdas receptoras (95%). La TnQ presenta facilidades tanto a las empresas como a los clientes como: conservación de genética por períodos prolongados y simplifica el transporte internacional (Martínez 2014).

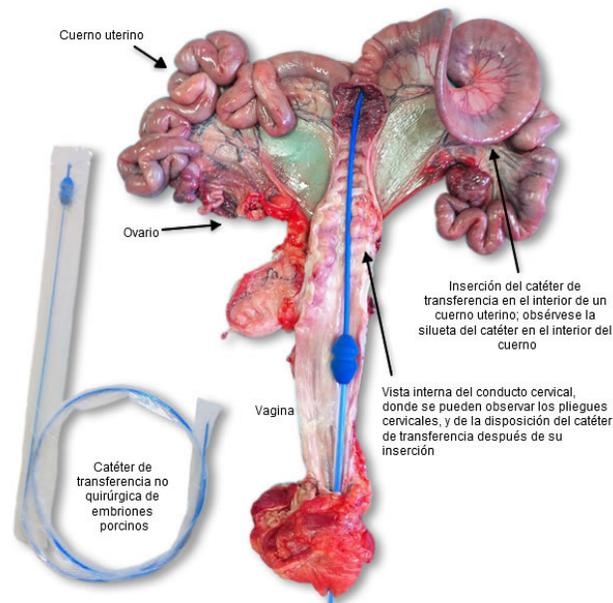


Figura 4. Transferencia de embriones no quirúrgica en cerdas (Martínez 2014).



Figura 5. Procedimiento de transferencia de embriones no quirúrgica en cerdas (Martínez 2014).

Un dato importante a la hora de la TE es la edad del embrión, los mayores éxitos se han conseguido con la TE de dos a cuatro células en el oviducto o del blastocisto en el cuerno uterino, en este último si es posible el abordaje transcervical (García Roselló 2008).

Otras acciones claves en la TE es la higiene, con el uso de material estéril y uso de antibióticos (García Roselló 2008).

Cabe destacar que juega un papel clave el reconocimiento y mantenimiento de la gestación para lo cual se están utilizando dos técnicas:

1. Administración exógena de estrógenos los cuales actúan alterando la liberación de prostaglandinas del útero. Administrados en intervalos entre los días once y quince de la gestación.
2. Administración de Hormona Gonadotropina Coriónica equina (eCG) y Gonadotropina Coriónica humana (hCG) (Trujillo 2005), en el día 9 y 12 de la gestación respectivamente, para la inducción de cuerpos lúteos, que son refractarios a los efectos luteolíticos de la prostaglandina, liberada el día 14 del ciclo estral original, lo que proporciona una fuente continua de progesterona capaz de mantener la gestación (García Roselló 2008).

Algunas de las ventajas de la implementación de este proceso (TE) son: desarrollo de nuevas razas, mejora genética, sanitaria y reproductiva, se puede realizar la importación y exportación de material embrionario, mantener material genético en la explotación porcina y reducción de problema por infertilidad (Córdova Izquierdo 2002).

7. CONCLUSIÓN

- El logro del proceso de producción de embriones *in vitro* está determinado por la calidad de los ovocitos y del contenido seminal, así como por la similitud o poca variabilidad del medio de donde se extraen con respecto al medio donde se procesan. La transferencia de embriones es sin duda un paso importante en el avance de la biotecnología debido a las ventajas que se presentan en cuanto optimización del porcentaje de preñez, la disminución del porcentaje de trasmisión de anomalías genéticas en el embrión y como consecuencia la obtención de crías de alto valor genético.

8. RECOMENDACIONES

- Definir el mejor estadio para la obtención de los óvulos y la transferencia de los embriones a la hembra receptora.
- Exponer el mejor medio para el desarrollo de los gametos y embriones.
- Estudiar a totalidad los componentes que conforman los suplementos indefinidos.
- Investigar sobre técnicas para obtención de óvulos de forma no quirúrgica.
- Reducir el porcentaje de polispermia en la PIV.
- Estandarizar los tiempos para cada una de las etapas como: MIV, FIV y CIV.

9. LITERATURA CITADA

- Boylan WJ, Rempel WE, Comstock RE. 1961. Heritability of Litter Size in Swine. *Journal of Animal Science*. 20(3): 566–568. <https://doi.org/10.2527/jas1961.203566x>
- Camino Y, Acosta M, González F. 2019. Una nota sobre la concentración espermática de semen de verracos CC21 a partir de dos técnicas de medición. *Revista Computarizada de Producción Porcina*. 26(1): 46-50.
- Córdova-Izquierdo A. 2002. Biotecnología de la Reproducción en la Especie Porcina: Papel de la Criopreservación Espermática. *Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. pp. 323-325
- Córdova-Izquierdo A. 2020. Puntos a tomar en cuenta en la valoración práctica fenotípica de la capacidad reproductiva del verraco. México: Porcicultura.com; [consultado el 11 de ago de 2020]. <https://www.porcicultura.com/destacado/Puntos-a-tomar-en-cuenta-en-la-valoracion-practica-fenotipica-de-la-capacidad-reproductiva-del-verraco>
- Córdova-Izquierdo A, Córdova-Jiménez C. 2007. Control reproductivo del verraco. *Revista Veterinaria*. 18(1): 65-69.
- Coy P, Gadea J, Romar R, Matás C, García E. 2002. Effect of *in vitro* fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and *in vitro* development in pigs. *Reproduction*. 124 (2): 279–288.
- Ducolomb Ramírez YC, Romo García S, Balcázar Sánchez JA, Rodarte Covarrubias LF, Casas Hernández E, Fragozo González G del C, Sciutto Conde EL, Betancourt Rule M. 2005. Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos *in vitro*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. pp. 425–432. <https://www.redalyc.org/pdf/613/61343312.pdf>
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2020. Global action needed now to halt spread of deadly pig disease. Italia: FAO; [actualizado el 26 de jul. de 2020; consultado el 3 de ago. de 2020]. En. <http://www.fao.org/news/story/en/item/1298721/icode/>.
- Fernández Reyes F, Hernández Pichardo JE, Rosales Ávila M del R. 2009. Efecto de la adición de FSH y LH en el medio sobre la maduración y el desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos de cerda. *Revista de Salud Animal*. 31(2): 122–128.
- Fernández Reyes F, Hernández Pichardo JE, Reyes Flores M del C. 2010. Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. *Revista de Salud Animal*. 32(2): 78–83.
- Gadea Mateos J, Ruiz S, Coy P, Romar R, Campos I, Poto A, Peinado B, Zubillaga O. 1998. Fecundación *in vitro* con semen congelado en la especie porcina. *Archivos de Zootecnia*. 47: 299–304.
- Gadea J. 2001. La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación *in vitro*. *Producción y Sanidad Animales*. 16(1): 63-77.

- García Roselló E. 2008. Análisis de diferentes factores que afectan al rendimiento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en la especie porcina [Tesis]. Universidad de Murcia, Murcia-España. 233 p.
- García-Vásquez F, Matás C. 2001. Cultivo embrionario *in vitro* en especie porcina. España: AxonVeterinaria; [consultado el 23 ago. de 2020]. [http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/33/cys_33_40-45_Cultivo embrionario *in vitro* en la especie porcina \(I\).pdf](http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/33/cys_33_40-45_Cultivo_embionario_in_vitro_en_la_especie_porcina_(I).pdf)
- Gil Corbalán MA. 2008. Influencia de diferentes condiciones de co-cultivo sobre la fecundación y la producción *in vitro* de embriones porcinos [Tesis]. Universidad de Murcia, Murcia-España. 155 p.
- Gomis Almendro J. 2013. Advances in cryopreservation and non-surgical transfer of porcine embryos [Tesis]. Universidad de Murcia, Murcia-España. 101 p.
- González E. 2006. Uso de leche descremada en polvo a diferentes concentraciones como extensor de semen porcino [Tesis]. Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad de Guatemala-Guatemala. 40 p.
- González-Figueroa H, González-Molfino HM. 2005. Maturation of pig oocytes *in vitro* in a medium with pyruvate. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 38: 869-872.
- Grau CL. 2020. Espectrofotómetro: Colectivo de autores. Ecuador: EcuRed; [consultado el 4 de sep de 2020]. <https://www.ecured.cu/Espectrofot%C3%B3metro>
- Hazeleger W, Kemp B. 2001. Recent developments in pig embryo transfer. Theriogenology. 56(8): 1321–1331. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00633-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00633-1)
- Hernández Fonseca H. 2010. Biotecnología. Revista Científica Maracaibo. 20(3): 225–226.
- Hernández JA. 1998. Variación anual de la calidad de semen porcino y su relación con parámetros reproductivos [Tesis]. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey-México. 92 p.
- Latorre Gorriz M. 2006. La nutrición del verraco. Ganadería, ISSN 1695-1123, Año 6, N° 44, 2006, pp. 46-50.
- Luchetti MM, Moronocini G, Svegliati S, Larcher F, Avvedimento EV, Gabrielli A. 2017. Inseminación artificial en cerdas: ¿Es aplicable la post-cervical en nulíparas? Facultad de Ciencias Veterinarias-UBA. 69(8): 1703-1704.
- Marinone A, Káiser G, Hozbor F, Mucci N. 2018. Biotécnicas reproductivas en la especie porcina: pasado, presente y futuro. Argentina: INTA; [consultado el 8 de ago. de 2020]. <http://ria.inta.gob.ar/contenido/biotecnicas-reproductivas-en-la-especie-porcina-pasado-presente-y-futuro>
- Martínez EA. 2014. La transferencia no quirúrgica de embriones porcinos es hoy una realidad. España: 3tres3.com; [consultado el 21 de ago. de 2020]. https://www.3tres3.com/articulos/la-transferencia-no-quirurgica-de-embriones-porcinos-es-una-realidad_33354/
- Martínez Madrid B. 2002. Estudio de la fecundación *in vitro* en porcino: reducción de la polispermia y optimización de la producción *in vitro* de embriones [Tesis]. Universidad Complutense de Madrid, Madrid-España. 225 p.

- Mucci N, Aller JF, Kaiser GG, Hozbor F, Alberio RH. 2006. Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. Archivos de Medicina Veterinaria. 38(2): 97-104.
- Muñoz Valdez MÁ. 2005. Fertilización *in vitro* en cerdos [Tesis]. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí-México. 47 p.
- Niemann H, Rath D. 2001. Progress in reproductive biotechnology in swine. Theriogenology. 56(8): 1291-1304. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00630-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00630-6)
- Petters RM, Johnson BH, Reed ML, Archibong AE. 1990. Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo *in vitro*. Reproduction. 89(1): 269-275. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0890269>
- Pyoos-Daniels GM, Matthys Scholtz MM, Nedambale TL. 2019. The comparison of three media on the *in vitro* maturation rate of pig oocytes. South African Journal of Animal Science. 48(6): 1026-1031. doi: 10.4314/sajas.v48i6.4
- Quintero-Moreno A, González-Villalobos D, Garde B, Estes JJ, Fernández M, Carvalho-Crociata MR, Mejía JL, León W. 2008. Valoración morfométrica de la cabeza del espermatozoide del cerdo doméstico según su edad. Revista Científica. 19(2): 153-158.
- Real Academia Española. 2014. Transferir | Diccionario de la lengua española. Edición del Tricentenario 23 ed. Madrid, España. Editorial ASALE Disponible en <https://dle.rae.es/transferir?m=form>
- Rodríguez P, Franco E, Jiménez C. 2008. Estandarización de la prueba para espectrofotometría en la medición de concentración de semen bovino, equino, porcino, ovino y canino. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. 55(1): 22-28.
- Romar R. 2001. Efecto de las células oviductales y del *cumulus oophorus* sobre diferentes parámetros biológicos relacionados con la fecundación *in vitro* en la especie porcina [Tesis]. Universidad de Murcia, Murcia-España. 133 p.
- Ruiz S. 2010. Fecundación *in vitro* en la especie porcina: situación actual y perspectivas. Cría y Salud. 30: 66-70.
- Salazar L. 2017. Evaluación del efecto de un suplemento dietario sobre la Calidad seminal de cerdos reproductores [Tesis]. Universidad de Sucre, Sincelejo-Colombia. 101 p.
- Sonderman JP, Luebke JJ. 2008. Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. Theriogenology. 70(8): 1380–1383. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.009>
- Torres-Osorio V, Urrego R, Echeverri-Zuluaga JJ, López-Herrera A. 2019. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción *in vitro* de embriones mamíferos. Revisión. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 10(2): 433–459.
- Trujillo ME. 2005. Uso de hormonas exógenas en la producción porcina. México: AMVEC; [consultado el 23 de ago. de 2020]. https://www.amvec.com/memories/memorias/2005/2005_022.pdf
- Valverde-Abarca A, Madrigal-Valverde M, Camacho-Calvo M, Zambrana-Jiménez A, López L. 2018. Efecto de la composición racial sobre la calidad espermática de verracos. Agronomía Mesoamericana. 29(3): 485-506.

Yoon KW, Shin TY, Park JI, Roh S, Lim J, Lee BC, Hwang WS, Lee ES. 2000. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reproduction, Fertility and Development*, 12:133–139. doi: 10.1071/rd00027