

Proyectos de Investigación IVIA

MEMORIA CIENTIFICO-TÉCNICA

CODIGO: Proy_IVIA10/02

AREA: REPRODUCCIÓN ANIMAL.

TÍTULO DEL PROYECTO: Biotecnología de la reproducción animal

DURACIÓN PREVISTA: 4 AÑOS

CENTRO: CITA - SEGORBE

2. ANTECEDENTES-INTRODUCCIÓN

En la Comunitat Valenciana la actividad ganadera es fundamental tanto a nivel económico como social. La actividad ganadera (PFG) de la Comunitat Valenciana representa cerca del 21% de la Producción Final Agraria (PFA), lo que representa aproximadamente unos 570 millones de euros, sin tener en cuenta los aspectos nutritivos, sanitarios y de transformación. La ganadería presenta una importancia relativa todavía mayor si se considera que este tipo de actividad se localiza en áreas interiores y en zonas desfavorecidas, contribuyendo a la fijación de población en estas áreas mediante la creación de renta de sus habitantes, bien de forma principal o como complemento de otras actividades agrarias.

De entre las especies ganaderas más importantes en la Comunitat Valenciana destaca el **porcino** que representa aproximadamente el 42% de la PFG. Respecto al sector **vacuno**, éste representaría aproximadamente el 10% y la leche un 6% de la PFG. El sector lácteo de la Comunitat Valenciana está compuesto por el subsector de la producción de leche y el de la elaboración de quesos. El ganado bovino es el que genera mayor producción.

Es importante dotar a las explotaciones ganaderas de herramientas para incrementar su productividad. La biotecnología de la reproducción es una de ellas y, en la mayoría de veces, asociada a programas de mejora genética o a animales o razas con un elevado valor económico y/o social. En las especies ganaderas se practican técnicas reproductivas tales como la inseminación artificial, el control de la actividad ovárica para sincronizar celos y la transferencia de embriones. Igualmente, se han ido introduciendo la criobiología de gametos y embriones para poder separar en el tiempo la fase de producción de gametos o embriones de la fase de transferencia o inseminación y, por lo tanto, dar mayor flexibilidad y practicidad al proceso.

El desarrollo y aplicación de biotecnologías reproductivas han supuesto un incremento en la productividad de las explotaciones, asociadas al uso de animales de elevado valor genético. Dentro de las biotecnologías reproductivas existentes, la inseminación artificial es la más utilizada y la que más ha contribuido a la mejora de las explotaciones, siendo el ganado vacuno lechero un claro exponente del avance genético alcanzado. La inseminación artificial presenta una serie de ventajas con respecto a la monta natural, ya que permite una reducción en el número de machos en la explotación, el uso de un mismo macho para la inseminación de varias hembras, la limitación en la difusión de enfermedades venéreas y, en general, permite realizar pautas de manejo reproductivo más eficientes. No obstante, para que un plan de inseminación artificial sea implementado con éxito es necesaria una exquisita elección de los reproductores y una detección del celo eficaz en las hembras. El control exhaustivo de la reproducción es de vital importancia para evitar períodos improductivos de los animales, así como para racionalizar el uso de la mano de obra.

En la actualidad, la mayoría de las inseminaciones se realizan con semen conservado en estado líquido que presenta alta fertilidad, aunque se deteriora en un corto periodo de tiempo (mayor o menor dependiendo de la especie). Las ventajas que presenta la inseminación artificial se incrementan cuando se utiliza semen crioconservado, ya que este tipo

de semen se mantiene durante un periodo de tiempo indefinido, lo que permite disociar el momento de la recuperación del de la utilización del semen. Esta característica presenta una gran ventaja, ya que posibilita utilizar machos de elevado valor genético aun en el caso de que hayan desaparecido y permite una gestión más racional de la mano de obra y de las dosis de semen en los centros de inseminación, evitando la acumulación del trabajo en determinados días de la semana, así como problemas en determinadas épocas del año por descenso de la producción de semen. Por otra parte, este tipo de semen sería en principio más seguro, ya que se podrían realizar los análisis sanitarios pertinentes para descartar cualquier tipo de problema.

A pesar de las enormes ventajas que se derivan del uso del semen congelado-descongelado, la realidad es que únicamente se utiliza a nivel comercial en el ganado vacuno de leche, mientras que su uso en otro tipo de producciones se limita a condiciones experimentales, debido fundamentalmente a la pérdida de fertilidad que se asocia a este tipo de semen mediante técnicas de inseminación tradicionales, y a la creación de bancos de recursos genéticos.

Tras la descongelación se observa un descenso en la calidad espermática, estimándose que alrededor del 50% de los espermatozoides resultan dañados irreversiblemente, y de la población que logra sobrevivir, sólo un 10% es completamente funcional. Esta pérdida de funcionalidad obliga a aumentar el número de espermatozoides en la dosis de inseminación, a acercar el momento de la inseminación al de la ovulación, y a realizar inseminaciones profundas en el tracto reproductivo femenino. Con estas estrategias se logra incrementar la fertilidad de las dosis congeladas, pero en ocasiones suponen un coste adicional en su aplicación, pudiendo llegar a hacer inviable su implantación real.

La producción *in vitro* (PIV) de embriones en mamíferos es una tecnología con múltiples aplicaciones tanto en producción animal como en biomedicina. Así, esta técnica posibilita dotarnos de los conocimientos básicos para entender lo que ocurre *in vivo* y para poder abordar otras líneas de investigación asociadas a la tecnología embrionaria como son la criopreservación de gametos y embriones y la transferencia de embriones. La PIV de embriones de calidad a partir de material de matadero (ovarios de animales de abasto) es crucial en mamíferos de especies ganaderas. Esta estrategia es la más barata y permite disponer de un número elevado de efectivos para poder abordar con garantías el desarrollo de las líneas de investigación en tales especies.

Desde otra mirada completamente diferente, en la Comunidad Valenciana existen dos razas autóctonas reconocidas por el actual MARM, la raza ovina Guirra y la raza aviaria Gallina Valenciana de Chulilla. Ambas poblaciones están siendo objeto de proyectos de investigación nacionales contribuyendo a la conservación de recursos genéticos. En este momento se requiere la creación de un banco de semen de gallos de esta raza autóctona, como una de las vías de conservación.

2. OBJETIVOS DEL PROYECTO Y ACTIVIDADES

1. PRODUCCIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES DE VACUNO

En 2003, según la Asociación Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS), se produjeron y transfirieron en el mundo más de 600.000 embriones de vacuno de los cuales más de un 15% fueron producidos *in vitro* (PIV).

Las posibles aplicaciones de la producción *in vitro* de embriones dependerán en gran medida del origen de los oocitos y en consecuencia de su valor genético, esto es, si proceden o no de un animal de alto valor genético. Cuando el oocito procede de un animal de alto valor genético, ya sea dentro de un programa de producción o de conservación de recursos, asociamos la obtención de estos oocitos a la técnica de la OPU (Ovum Pick-Up), a no ser que el animal haya muerto y se recuperen dichos oocitos de los ovarios del animal muerto mediante técnicas típicas de laboratorio que se utilizan con ovarios de animales sacrificados en un matadero.

La OPU se basa en la recolección de los oocitos mediante la punción de los folículos del ovario guiada con la ayuda de un ecógrafo. La recogida no es quirúrgica y se utiliza un tranquilizante y anestesia local. Esta técnica se realiza introduciendo el transductor del ecógrafo y una aguja por la vagina. Del líquido folicular aspirado, se aíslan los óvulos que se procesarán a continuación madurándolos en un sistema *in vitro*, posteriormente se fecundarán y cultivarán *in vitro* hasta el estadio de mórula o blastocisto. En este estadio, los embriones se pueden congelar o transferir a una hembra receptora. Mediante esta técnica se pueden recuperar aproximadamente 5 óvulos por sesión.

2. PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES MEDIANTE LA ICSI EN PORCINO Y VACUNO

La producción de embriones de porcino gracias a técnicas de maduración y fecundación *in vitro* (cocultivo de los oocitos con los espermatozoides en un medio adecuado) se ha visto frenada por la elevada incidencia de polispermia, la cual podría estar en parte asociada con un defecto en la maduración citoplasmática de los ovocitos. Posiblemente otros mecanismos podrían intervenir *in vivo*, facilitando la penetración de un sólo espermatozoide en el oocito, de hecho el oviducto podría jugar un papel regulador en la llegada y en la capacitación de los espermatozoides. Una de las soluciones a los problemas de polispermia podría ser la Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que se basa en fecundar un oocito metafase II mediante la inyección directa del espermatozoide en el interior del citoplasma. Esta técnica se utiliza en reproducción humana cuando se presentan casos de infertilidad masculina. También resulta la ICSI de gran utilidad cuando la calidad de las muestras de semen es deficiente, ya que en la ICSI no se requiere una elevada motilidad del semen y se necesita un menor número de espermatozoides. Sin embargo, la ICSI hoy en día no es eficiente ni en porcino, ni en vacuno, siendo uno de los principales problemas en porcino la incapacidad de los oocitos para descondensar la cabeza del espermatozoide. Es por ello que parece necesario optimizar la producción de embriones mediante ICSI, tanto en porcino como en vacuno.

3. MEJORA DE LA FERTILIDAD OPTIMIZANDO PROTOCOLOS DE EVALUACIÓN Y CONGELACIÓN DE SEMEN EN PORCINO, CAPRINO Y AVICULTURA

Se considera que la supervivencia tras la congelación es del 50% de los espermatozoides viables de la muestra fresca y existe una gran variabilidad individual. Además, un factor muy limitante en los espermatozoides congelados es la escasa longevidad que presentan tras la descongelación, incluso en el caso de machos buenos congeladores. Por otra parte, la persistencia de machos que presentan mala calidad tras la descongelación puede representar un problema en los esquemas de mejora genética, en los que interesa utilizar el semen de aquellos machos mejorantes para el carácter objeto de selección. Para mejorar la fertilidad del semen crioconservado tras la inseminación artificial hay que trabajar en dos vertientes: en la mejora de los protocolos de crioconservación y en el desarrollo de estrategias de inseminación más eficientes. En cuanto a la mejora en los procesos de crioconservación, es necesario trabajar en el desarrollo de diluyentes y protocolos que permitan obtener un mayor número de espermatozoides que sobrevivan al proceso de crioconservación del mayor número de machos posible.

Durante el proceso de crioconservación las células sufren daños irreversibles debidos en parte a la formación de hielo intracelular, a los choques osmóticos y a las modificaciones que se producen en las membranas como consecuencia del descenso de temperatura. Los crioprotectores permiten que un mayor número de espermatozoides soporten el proceso de crioconservación, pero tanto su adición como su eliminación provocan cambios osmóticos que dañan a los espermatozoides, debido a la diferencia de permeabilidad de la membrana plasmática al agua y a los crioprotectores. Por otra parte, durante el descenso de la temperatura que tiene lugar en el proceso de congelación del semen se producen cambios de fase en las membranas (de estado líquido a estado gel) que las dañan. A pesar de los esfuerzos realizados para desarrollar protocolos de congelación, los resultados en términos de calidad de los espermatozoides tras la congelación son todavía subóptimos.

El colesterol juega un papel muy importante en la regulación de la fluidez de las membranas y los espermatozoides de especies cuyas membranas presentan un ratio colesterol:fosfolípidos elevado (conejos, humanos) son más resistentes a los daños que se producen como consecuencia del descenso de la temperatura ("cold shock") que los espermatozoides de especies con un ratio menor (moruecos, caballos, cerdos, toros), siendo el ratio colesterol:fosfolípidos intermedio en el caso de la especie caprina. El contenido en colesterol es manipulable mediante el uso de ciclodextrinas, y el tratamiento de los espermatozoides con colesterol previamente a la congelación ha sido una de las últimas estrategias utilizadas para mejorar la calidad del semen crioconservado en especies sensibles al "cold shock". Con esta estrategia, se han observado mejoras en la calidad de los espermatozoides de numerosas especies post-descongelación, tales como vacuno, ovino, caprino, equino, burros o ratones.

A pesar de que esta estrategia podría ser muy beneficiosa para las especies caprina y porcina, es imprescindible determinar el protocolo de adición del colesterol, ya que cuando se introducen cambios en los protocolos habituales de congelación y se quieren obtener unas mínimas garantías de éxito en su implantación, es necesario que la modificación introducida sea lo más flexible posible para que pueda introducirse en la mayoría de protocolos que existan para esa especie..

4. BANCO DE SEMEN DE LA RAZA AVÍCOLA AUTÓCTONA GALLINA VALENCIANA DE CHULLILLA.

Es de destacar la gran importancia que presenta el semen crioconservado en los esquemas de conservación de recursos genéticos animales, tanto de especies domésticas (razas en peligro de extinción o razas de elevado valor que podrían desaparecer en el caso de epizootias) como de especies exóticas. Los sistemas de producción intensivos han provocado la disminución del censo o la desaparición de razas autóctonas a favor de otras estirpes mucho más productivas en este tipo de sistemas. No obstante, con las nuevas estrategias de sostenibilidad estas razas podrían ser de gran interés para el aprovechamiento de recursos en sistemas de producción extensivos, por lo que es necesario conservar el material genético de estos animales para poder recuperar las razas en un futuro. Los protocolos de congelación de espermatozoides en las especies domésticas son la base de los protocolos de otras especies de animales salvajes en los que la disponibilidad de semen es escasa, por lo que cualquier avance realizado en este campo podría beneficiar colateralmente a otras especies. En la actualidad, y a pesar de los esfuerzos realizados para desarrollar métodos de conservación eficaces, la realidad es que en numerosas ocasiones se crean bancos de recursos genéticos en los que se almacenan espermatozoides de dudosa capacidad fecundante. Es por ello necesario continuar con las investigaciones en esta área, para evitar crear "cementérios" de células crioconservadas, con dudosa capacidad de regenerar poblaciones de interés en caso de necesidad.