

# Producción *in vitro* de embriones de porcino: Problemas y aplicaciones

E. García-Mengual, I. Salvador, M.A. Silvestre  
*Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA)*  
*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias*

**La biotecnología de la reproducción surge como respuesta a ciertas demandas del sector ganadero, encaminadas sobre todo a mejorar la productividad. De las biotecnologías de la reproducción, la inseminación artificial con semen refrigerado y congelado (en menor medida) son las más difundidas. Respecto a la producción *in vitro* (PIV) de embriones, ésta ofrece nuevas posibilidades tanto en la utilización de los animales procedentes de líneas genéticamente mejoradas, así como en el campo de la biomedicina, como veremos a continuación.**

**D**esde que en 1981 naciera en EEUU el primer ternero obtenido de la producción de un embrión *in vitro* (Brackett *et al.*, 1982), la técnica ha mejorado sensiblemente. La PIV de embriones se divide en tres etapas: maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y cultivo embrionario (CE). En vacuno, la técnica de PIV está más desarrollada que en otras es-

pecies, y ya se aplica de forma comercial. En porcino, sin embargo la MIV de oocitos y a su vez la PIV de embriones se encuentra actualmente en fase experimental fundamentalmente debido a sus bajas eficacias. La PIV a gran escala de embriones de porcino, se enfrenta a una serie de dificultades técnicas debido a las características fisiológicas de sus gametos y embriones, especialmente la canti-

dad de lípidos que contienen sus óvulos y embriones. De entre estas dificultades se puede destacar la baja eficacia de la MIV y de las técnicas de FIV, así como la poca capacidad de desarrollo de los embriones PIV en las condiciones actuales de cultivo embrionario. En el presente trabajo se hace una breve revisión de las técnicas actuales de PIV de embriones y de sus aplicaciones.

### Obtención de oocitos de porcino y maduración *in vitro*

#### Recuperación de oocitos

La obtención quirúrgica de oocitos o embriones de animales donantes resulta lenta, cara, y proporciona una cantidad de material limitada. La utilización de ovarios procedentes de matadero ofrece ventajas cruciales en este aspecto: permite obtener de forma rápida, sencilla y económica una gran cantidad de ovarios de cerdas prepúberes que serán la fuente principal de oocitos inmaduros. Una vez recogidos los ovarios en el matadero, se trasladan al laboratorio en un medio tamporado enriquecido con glucosa, piruvato sódico y antibióticos, atemperado a 28 °C. Se seleccionan aquellos folículos que miden entre 3 y 7 mm de diámetro, y se recuperan los complejos cúmulo-oocito mediante la punción o la aspiración folicular, que son las técnicas de recuperación más empleadas. Una vez recuperados y catalogados, los óvulos se maduran *in vitro* a 38,5 °C, 5% CO<sub>2</sub> en aire y una humedad relativa del 95%.

#### MIV de oocitos de porcino

En general, el proceso de maduración oocitaria puede dividirse en dos niveles: nuclear y citoplasmático. La maduración nuclear (o reanudación de la meiosis) se refiere a la propia evolución del núcleo del oocito desde el estado de Profase I (vesícula germinal), en el que se encontraba bloqueado desde el nacimiento, hasta el estado fecundable de Metafase II. La maduración citoplasmática es un término más amplio que se refiere a otros acontecimientos de la maduración que no están directamente relacionados con procesos meióticos, pero sí con otros procesos que preparan al oocito para la fecundación y el desarrollo preimplantacional (Abeydeera *et al.*, 2002). Además, durante la madura-

ción citoplasmática, también tiene lugar la reorganización de orgánulos citoplasmáticos, como las mitocondrias y los gránulos corticales.

Normalmente, la apariencia del oocito antes de iniciar el proceso de maduración, y el estado meiótico tras la MIV (expulsión del primer corpúsculo polar) era utilizada como marcador de calidad oocitaria y por lo tanto del proceso de MIV, sin embargo no existe un criterio morfológico fiable que permita evaluar la maduración citoplasmática. Tan sólo disponemos de criterios funcionales, se trata de observar la tasa de fecundación normal (monospermia) tras FIV y la tasa de desarrollo (blastocistos). Otro criterio alternativo y que evita el problema de la polispermia, consiste en activar de forma artificial (química o eléctrica) los oocitos, y comprobar el desarrollo partenogenota de los embriones hasta el estadio de blastocisto.

Hasta la fecha, la mayoría de medios empleados en MIV permitía que un gran número de ovocitos siguiera el proceso de maduración nuclear y alcanzara el estado de MII. Sin embargo a pesar de que los signos de maduración nuclear parecían ocurrir con normalidad, el citoplasma del ovocito fallaba con frecuencia a la hora de promover la formación del pronúcleo masculino tras la penetración espermática. Este fallo podía deberse a deficiencias presentes en los ovocitos en sí mismos y/o deficiencias en los sistemas de cultivo y MIV (Abeydeera, 2002). Como medio de maduración *in vitro* se pueden utilizar varios medios de cultivo (simples o complejos) que contengan suero o bien fluido folicular (FF) así como otros suplementos, como gonadotropinas y/o factores de crecimiento. De manera general, se aplica un periodo de cultivo *in vitro* de 44 horas, siendo suplementado el medio las primeras 22 horas con hormonas (PMSG y hCG o FSH y LH) y las siguientes 22 horas sin dicho suplemento hormonal.



Figura 1. Ovario de cerda prepúber.

#### Fecundación *In Vitro* (FIV)

La producción de embriones de porcino gracias a técnicas de MIV y FIV (cocultivo de los oocitos con los espermatozoides en un medio adecuado) se ha visto frenada por la elevada incidencia de polispermia (Coy y Romar, 2002; Lai *et al.*, 2001; Kren *et al.*, 2003). Además, si estos oocitos han sido previamente criopreservados, el problema de la polispermia se agrava por la temprana expulsión de los gránulos corticales (Vincent *et al.*, 1990). Los gránulos corticales juegan un papel muy importante en el bloqueo de la polispermia (bloqueo secundario de la polispermia). Este mecanismo parece funcionar tanto en ovocitos de cerdo madurados *in vivo* como *in vitro* (Wang *et al.*, 1998). Sin embargo el bloqueo primario de la polispermia (despolarización de la membrana citoplasmática, tras la fecundación, y que impide la entrada de un segundo espermatozoide) podría verse también alterado en los oocitos MIV (Mermillod *et al.*, 2003). Así pues la polispermia observada en porcino podría estar asociada con un defecto en la maduración citoplasmática de los ovocitos. Posiblemente otros mecanismos podrían intervenir *in vivo*, facilitando la penetración de

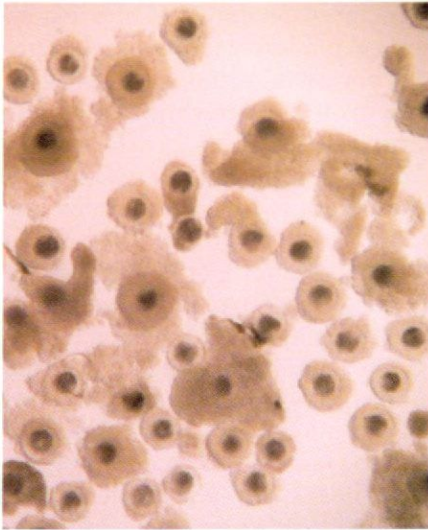


Figura 2. Complejos cúmulo-ooocito de porcino recién recuperados de los folículos.

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 (Rodríguez- Martínez *et al.*, 2001).

Una de las soluciones a este problema se basa en la reducción de la concentración de espermatozoides en contacto con el oocito durante la FIV, pero con ello sólo conseguimos reducir parcialmente el fenómeno de la polispermia; y a pesar de ello en la mayoría de los casos estos reajustes de concentración están asociados con tasas bajas de penetración oocitaria (Abeydeera *et al.*, 2002). Otra posible solución a los problemas de polispermia derivados de la FIV, es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), ya que mediante ésta técnica, con la ayuda de un micromanipulador, se asegura la inyección de un único espermatozoide en cada oocito. Sin embargo esta técnica tampoco está libre de complicaciones, el problema principal es la incapacidad de los oocitos para descondensar la cabeza del espermatozoide (Lee *et al.*, 2003). Mientras que el pronúcleo femenino es normal, la descondensación de la cabeza del espermatozoide no ocurre o resulta incompleta en aproximadamente el 50% de los oocitos inyectados. Este

fallo se debe fundamentalmente a la ausencia en el oocito del factor de formación del pronúcleo masculino (MPGF), siendo esta carencia especialmente importante en los oocitos MIV.

Por otro lado, cuando un espermatozoide fecunda de forma natural un oocito, tras la fusión de las membranas espermática y oocitaria, tan sólo el núcleo espermático desnudo se incorpora en el interior del citoplasma del oocito. De esta manera el oocito se activa y se reanuda la meiosis. Sin embargo, mediante la ICSI, el espermatozoide entero (con el acrosoma y las mitocondrias), acompañado por un pequeño volumen de medio de manipulación, se introduce en el citoplasma del oocito. Además de estos componentes accesorios la membrana intacta no permite actuar al MPGF que favorecería la descondensación del núcleo espermático y la formación del pronúcleo masculino. En este punto se han ensayado diferentes tratamientos de los espermatozoides con el fin de favorecer la formación del pronúcleo masculino.

#### Cultivo embrionario

Los embriones de mamíferos, cuando son sometidos a cultivo, su-

fren un bloqueo en el desarrollo en un estado preciso que varía según la especie. En el caso del cerdo, este bloqueo tiene lugar cuando el embrión se encuentra en el estado de cuatro células. A principios de los años 90, la introducción de nuevas técnicas de cultivo, gracias a Petters y Wells (1993), permitió llevar el desarrollo de embriones de porcino desde una célula hasta el estado de blastocisto. El medio NCSU, tal y como describieron Petters y Wells, fue y es actualmente (aunque con modificaciones) el más utilizado, ya que a pesar de no ser tan eficaz como los sistemas fisiológicos, era el medio de cultivo asociado a la mayor tasa de blastocisto (Macháty *et al.*, 1998). Sin embargo existe todavía una variabilidad importante entre los resultados obtenidos por los distintos laboratorios, y la eficacia del CE sigue siendo baja, situándose la tasa de blastocisto en torno a un 20-30%.

El disponer de un sistema eficaz de cultivo *in vitro* permite obtener embriones en el estadio de blastocisto, lo cual permite a su vez transferir los embriones en el útero, si se desea por vía no quirúrgica, seleccionar los embriones más aptos para el desarrollo. Cabe

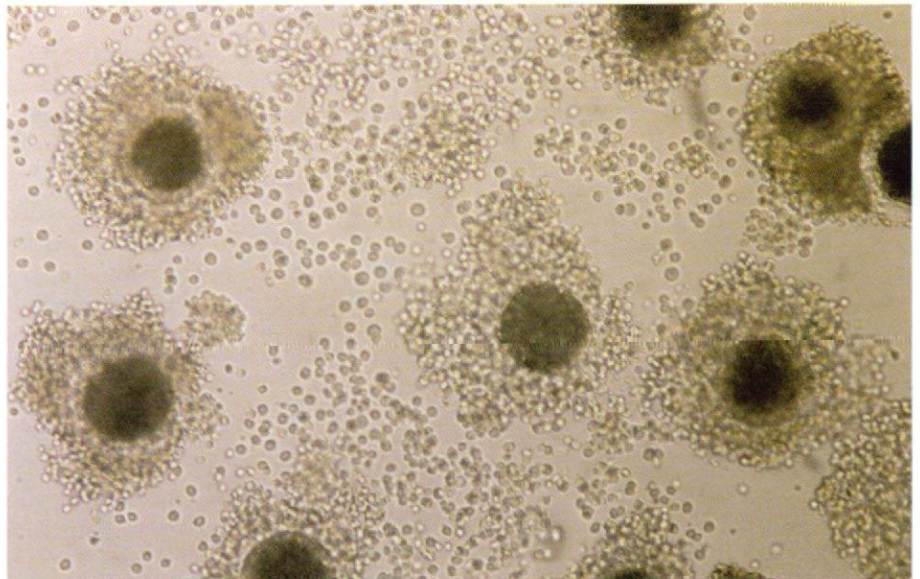
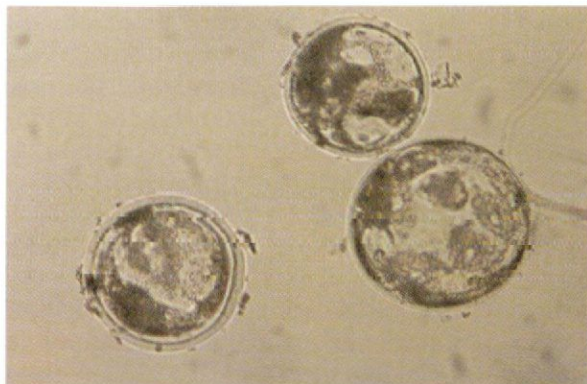


Figura 3. Complejos cúmulo-ooocito de porcino con los cúmulos expandidos a las 22 horas de cultivo *in vitro*.

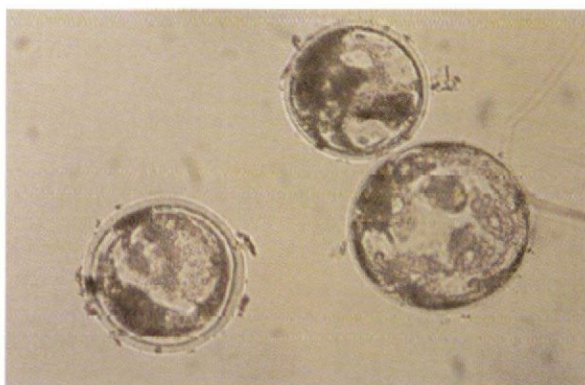


**Figura 4.** Embriones de porcino producidos *in vitro* en estadio de blastocisto mediante activación química.

también la posibilidad de realizar el diagnóstico genético preimplantacional y de aumentar las posibilidades de supervivencia tras la criopreservación (Mermillod *et al.*, 2003).

## Aplicaciones

Las aplicaciones de la PIV de embriones, son múltiples ya que nos dotan de los conocimientos básicos para poder abordar otras líneas de investigación como son la criopreservación de gametos y embriones, el trasplante de embriones, la clonación somática y la producción de embriones genéticamente modificados. La PIV de embriones de calidad a partir de material de matadero (ovarios de cerda prepúber) es crucial. Esta vía es la más barata y se dispone de un número ilimitado de efectivos (ooci-



**Figura 5.** Detalle de un embrión partenogenota de porcino producido *in vitro* en estadio de blastocisto escapado.

tos) para poder abordar con garantías las anteriores líneas.

Dentro del área de la criobiología se pueden abordar tanto la criopreservación de óvulos, aunque sus eficacias son muy bajas, como la de embriones en sus distintos estadios de desarrollo. El disponer de esta técnica junto a la de trasplante de embriones, tanto por métodos quirúrgicos como no quirúrgicos, podría facilitar el movimiento de recursos genéticos, minimizando la transmisión de enfermedades y reduciendo los costes de transporte en comparación con el transporte de animales vivos. Así la difusión de una línea mejorada genéticamente por ésta técnica sería factible en explotaciones libres de patógenos o que evite la entrada de animales vivos (fundamentalmente si se quiere sustituir una raza o línea) o localizada en otro país. La conservación de la biodiversidad (*ex-situ*) también es un objetivo alcanzable si se dominan estas técnicas, ya sea vía criopreservación de embriones o de células somáticas y su posterior clonación somática.

Ésta última técnica también puede ser abordada, siendo junto a la ICSI, unas de las técnicas, junto a la microinyección, para obtener cerdos genéticamente modificados (GM). Las aplicaciones de los animales GM son múltiples y especialmente interesantes en la especie porcina, debido fundamentalmente a su similitud fisiológica con el hombre. Así pueden ser utilizados los cerdos GM para xenotransplantes, es decir, como donantes de órganos en humanos. También pueden utilizarse como bio-

reactores, en el que el objetivo no sería el número de lechones destetados por cerda y año, sino los kg de una proteína determinada de uso farmacéutico. Respecto a la producción de cerdos GM para abasto, se han obtenido líneas de cerdos que excretan mucho menos fósforo en sus deyecciones, por lo que el purín es menos agresivo con el medioambiente. Estos animales secretan fitasa, que es una enzima que degrada el fósforo orgánico, y su eficacia es mayor que la de añadir fitasas al pienso. También se ha desarrollado otras líneas con la producción láctea modificada y en la que los lechones crecían más rápidamente y otra en la que la leche proporcionaba a los lechones protección pasiva frente a infecciones gastroentéricas. La resistencia a enfermedades es un punto interesante que afecta a otras especies como el vacuno, en la que se ha logrado vacas resistentes a la mastitis.

A pesar de las múltiples aplicaciones de la PIV de embriones, esta técnica aún está en fase experimental y de manera esporádica, aunque esperamos que sea por poco tiempo. ■

## Bibliografía

- Abeydeera. 2002. *Theriogenology* 57, 257-273.
- Brackett et al., 1982. *Biol Reprod*, 27, 147-148.
- Coy y Romar, 2002. *Reprod Fertil Dev*, 14, 275-286.
- Kren *et al.*, 2003. *Journal of Reproduction and Development* 49 (4): 271-273.
- Lai *et al.*, (2001) *Zygote*; 9 (4):339-346.
- Lee *et al.*, (1998) *Mol Repro Dev*; 50(2):221-8.
- Macháty *et al.* (1998). *Biol Reprod*; 59: 451-455.
- Mermillod *et al.*, 2003. *Journées Recherche porcine*, 35: 323-338.
- Petters y Wells.1993. *J Reprod Fertil*; 48: 61-73.
- Rodríguez-Martínez *et al.*, 2001. *Reprod Suppl*; 58: 129-145.
- Vincent *et al.*, 1990. *J Reprod Fertil*, 89:253-259.
- Wang *et al.*, 1998. *Biol. Reprod.* 58, 1357-1366.