

BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN ESPECIES GANADERAS



Francisco Marco Jiménez
José Salvador Vicente Antón

EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Biotecnología de la Reproducción en Especies Ganaderas

Mayo de 2012

Francisco Marco Jiménez

José Salvador Vicente Antón

EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Para citar esta publicación utilice la siguiente referencia bibliográfica:

Marco Jiménez, F. y Salvador Vicente Antón, J. (2012). *Biotecnología de la reproducción en especies Ganaderas*. Valencia : Editorial Universitat Politècnica de València.

Primera edición, 2012

© Editores:

Francisco Marco Jiménez
José Salvador Vicente Antón

© de la presente edición:

Editorial Universitat Politècnica de València
www.editorial.upv.es

Distribución: pedidos@editorial.upv.es
Tel. 96 387 70 12

Imprime: By print percom sl.

ISBN: 978-84-8363-874-3

Impreso bajo demanda

Ref. editorial: 676

Queda prohibida la reproducción, distribución, comercialización, transformación, y en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de todo o parte de los contenidos de esta obra sin autorización expresa y por escrito de sus autores.

Impreso en España

Prólogo

La cría de animales para satisfacer nuestras necesidades alimenticias conlleva el desarrollo de técnicas para incrementar la eficiencia reproductiva de éstas, favoreciendo la aplicación de los programas de selección y difusión genética. La biotecnología reproductiva se fundamenta en el conocimiento y control de la función reproductiva, incrementando las posibilidades de obtener descendencia de los animales genéticamente superiores, mediante el desarrollo de las tecnologías de inseminación y conservación del semen, de recuperación, conservación y transferencia de embriones, de producción de ovocitos o embriones in vivo e in vitro como la superovulación, el cultivo o la clonación, y del sexaje de espermatozoides o de embriones.

La inseminación artificial con semen fresco es, sin duda, la técnica reproductiva más utilizada y forma parte de la gestión reproductiva de la mayoría de las especies ganaderas. Ya en 1936 se estableció en Dinamarca la primera asociación de inseminación artificial de vacuno, nueve años después se desarrollaba el primer método de congelación de semen y en 1950 se constituía el primer banco de semen para vacuno (Inglaterra). Hoy en día, la inseminación en vacuno se realiza preferentemente con semen congelado. La transferencia de embriones ha contribuido decisivamente a mejorar la eficiencia reproductiva y en la difusión de genotipos.

La transferencia embrionaria conlleva la puesta a punto de técnicas de superovulación, recuperación, medios y métodos de conservación, y por supuesto, de las condiciones y técnica de transferencia. Una vez extraídos los embriones, el principal problema fue disociar el momento de la recuperación del de la transferencia e impedir que la viabilidad del embrión estuviese comprometida por su desarrollo en un ambiente inadecuado, a ello contribuyeron el desarrollo de medios y condiciones de cultivo y, la crioconservación en la década de los setenta. Aunque hoy en día todavía persisten problemas en la crioconservación asociados al estadio embrionario y a la especie.

Por último, el conocimiento de los procesos reproductivos ha permitido adentrarse en la producción embrionaria in vitro (recuperación, maduración y crioconservación ovocitaria, microinseminación y cultivo embrionario) no sólo como medio

de incrementar, aún más la eficiencia reproductiva, sino como herramientas para estudios de desarrollo, generación de clones, transgénicos o líneas celulares embrionarias.

En los capítulos de este libro se mostrarán los logros, avances y carencias actuales de la biotecnología reproductiva de especies ganaderas como el vacuno, ovino, caprino, porcino, conejo y aves.

Francisco Marco Jiménez
fmarco@dca.upv.es

José Salvador Vicente Antón
jvicent@dca.upv.es

Autores

- **José Alfonso Abecia Martínez.** Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza. alf@unizar.es
- **Jean Pierre Brillard.** FERTIL'AVI. 37360 Rouziers de Touraine, France brillard.jp@orange.fr
- **Fernando Forcada Miranda.** Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza. forcada@unizar.es
- **Fernando Román López Gatiús.** Departamento de Producción Animal. Universitat de Lleida. flopez@prodan.udl.cat
- **Francisco Marco Jiménez.** Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universidad Politécnica de Valencia. fmarco@dca.upv.es
- **Eva Mocé Cervera.** Centro de Tecnología Animal. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. moce_eva@gva.es
- **Dimitrios Rizos.** Dpto. de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. drizos@inia.es
- **Jordi Roca Aleu.** Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Universidad de Murcia. roca@um.es
- **M^a Antonia Gil Corbalán.** Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Universidad de Murcia. mariagil@um.es
- **Pilar Santolaria Blasco.** Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza. psantola@unizar.es
- **Jose Salvador Vicente Antón.** Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universidad Politécnica de Valencia. jvicent@dca.upv.es
- **Maria Pilar Viudes de Castro.** Centro de Tecnología Animal. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. viudes.mar@gva.es
- **Jesús Yániz Pérez de Albéniz.** Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza. jyaniz@unizar.es

Índice general

Prólogo	I
Autores	III
Índice general	V
I Rumiantes	1
1 Vacuno:Inseminación Artificial	3
1.1 Sincronización del estro	3
1.1.1 Tratamiento con prostaglandinas	4
1.1.2 Combinaciones de progesterona y prostaglandinas	4
1.1.3 Combinaciones de prostaglandina, estrógeno y gonadotropina coriónica humana	5
1.1.4 Combinaciones de GnRH y prostaglandinas	5
1.1.5 Conclusiones	6
1.2 Inseminación artificial	7
1.2.1 ¿Qué vacas inseminar?	7
1.2.2 ¿Cuándo inseminar?	8
1.2.3 ¿Como inseminar?	9
1.3 Factores que afectan a la fertilidad en vacuno	11
1.3.1 Genética	11
1.3.2 Nutrición	12
1.3.3 Manejo	12

1.3.4 Factores ambientales	13
1.4 Bibliografía	14
2 Vacuno: Producción de embriones <i>in vitro</i>	17
2.1 Post-fertilization Culture Environment and Quality of the Embryos Produced <i>In Vitro</i>	18
2.1.1 Light Microscopy and Ultrastructural Morphology	20
2.1.2 Cryotolerance	21
2.1.3 Gene Expression	22
2.2 Post-fertilization Culture Environment and Long-term Consequences	23
2.3 Post-fertilization Culture Environment and Sex Ratio.	24
2.4 Influence of Progesterone in embryo development in cattle.	26
2.4.1 Progesterone and early embryo and conceptus	26
2.4.2 Effects of progesterone on the endometrium.	27
2.4.3 Effects of progesterone on the endometrium.	28
2.5 Transcriptome Changes at the Initiation of Elongation in the Bovine Conceptus	29
2.6 Bibliography	31
3 Ovino	45
3.1 Interpretación del fotoperiodo por el ganado ovino	46
3.2 Traducción del mensaje fotoperiódico: Melatonina	47
3.3 Inseminación artificial	49
3.3.1 Conservación del semen	50
3.3.2 Inseminación artificial en granjas ecológicas.	50
3.4 Producción <i>in vivo</i> de embriones.	51
3.5 Producción <i>in vitro</i> de embriones	53
3.5.1 Extracción de ovocitos.	54
3.5.2 Maduración <i>in vitro</i>	55
3.5.3 Fecundación <i>in vitro</i>	56
3.5.4 Cultivo de embriones <i>in vitro</i>	57
3.6 Bibliografía	58

4 Caprino	59
4.1 Hembra	59
4.1.1 Anatómo-Fisiología de la hembra	59
4.1.2 Métodos de sincronización del celo	61
4.1.3 Tratamiento de superovulación	64
4.1.4 Producción de embriones <i>in vitro</i>	65
4.1.5 Transferencia de embriones	65
4.1.6 Aplicación de la transgénesis	67
4.1.7 Aplicación de la clonación	67
4.2 Macho	68
4.2.1 Estacionalidad en la producción de semen	68
4.2.2 Control reproductivo	69
4.2.3 Selección de los machos para los centros de inseminación artificial	70
4.2.4 Conservación del semen y otras tecnologías	71
4.2.5 Inseminación artificial y factores que influyen en los resultados	77
4.3 Bibliografía	79
II Monogástricos	81
5 Porcino	83
5.1 Inseminación artificial: procedimientos y estrategias	83
5.1.1 Introducción	83
5.1.2 Procedimientos de inseminación	83
5.2 Estrategias de inseminación	88
5.3 Tecnologías espermáticas	96
5.3.1 Introducción	96
5.3.2 Refrigeración espermática	97
5.3.3 Criopreservación espermática	99
5.3.4 Espermatozoides sexados	102
5.3.5 Espermatozoides encapsulados	103
5.4 Tecnologías de embriones	104
5.4.1 Producción <i>in vitro</i> de embriones	104
5.4.2 Vitrificación de embriones	109
5.4.3 Transgénicos	112
5.4.4 Transferencia nuclear de células somáticas	114

5.5	Transferencia de embriones.	116
5.6	Bibliografía	120
6	Conejo	121
6.1	Fisiología reproductiva	122
6.1.1	Macho.	122
6.1.2	Hembra	124
6.2	Evaluación, difusión y conservación de recursos genéticos	128
6.2.1	Inseminación Artificial.	128
6.2.2	Producción y crionservación de embriones. Restauración de poblaciones . .	135
6.3	Producción de embriones <i>in vitro</i>	143
6.3.1	Microinseminación	143
6.3.2	Clonación embrionaria y somática.	144
6.3.3	Partenogenotas y <i>Stem Sells</i>	145
6.4	Bibliografía	146
III	Poultry	153
7	Physiological bases of reproduction	155
7.1	General:Major specifications of avian reproduction.	155
7.1.1	At anatomical and genetical level	155
7.1.2	At functional level	156
7.2	Reproductive organs in the female.	156
7.2.1	Ovary	156
7.2.2	Follicle maturation (from Etches, 1994)	157
7.2.3	Ovulatory cycle	158
7.2.4	Oviduct.	159
7.2.5	Egg formation in the various oviduct segments.	160
7.3	Prolonged sperm storage in the oviduct	162
7.3.1	Sperm storage sites.	162
7.3.2	Mechanisms of sperm selection.	163
7.3.3	Physiological bases to maintain sperm viability and fertilizing potential in vivo.	165
7.4	Male reproduction (chicken model) and the reproductive season.	166
7.4.1	Main stages of gonadal development in the male chicken.	166

7.4.2 The reproductive season.	169
7.5 Applied physiology in poultry:Control of fertility in breeder FLocks	173
7.5.1 Genetic factors and feed restrictions	173
7.5.2 Reproductive effectiveness of gametes	174
7.5.3 Management factors to control fertility.	175
7.5.4 Seasonal factors involved in fertility control.	176
7.5.5 Sanitary and behavioral aspects	177
7.6 Conclusions	178
8 Biotechnologies of reproduction:Dreams and reality	179
8.1 Introduction	179
8.2 Biotechnologies dedicated to semen storage.	180
8.2.1 Procedures to handle semen for limited periods of time	180
8.2.2 Monitoring long term <i>in vitro</i> semen preservation	181
8.3 Biotechnologies referring to the oocyte and to <i>in vitro</i> fertilisation	182
8.4 Routes to access gene transfer in avian species	183
8.4.1 <i>In vitro</i> culture of avian embryo.	183
8.4.2 Manipulation of the avian embryo.	184
8.4.3 Nuclear transfer (cloning).	184
8.4.4 The male route	186
8.4.5 Sex determinism	187
8.5 Conclusions	187

Parte I

Rumiantes

Capítulo 1

Vacuno:Inseminación Artificial

J.L. Yániz¹, P. Santolaria¹, F. López-Gatius²

1-Universidad de Zaragoza

2-Universitat de Lleida

En este capítulo se hace una revisión sobre biotecnologías reproductivas relacionadas con la inseminación artificial. Para ello se revisan los métodos de sincronización del estro, la técnica de la inseminación artificial y los factores que afectan a la fertilidad tras la misma. Nos centraremos sobre todo en la vaca lechera, puesto que es en ella en la que más se aplican estas biotecnologías reproductivas.

1.1 Sincronización del estro

Los tratamientos encaminados a sincronizar el estro o inducir la ovulación permiten un manejo efectivo de la inseminación a tiempo pre-determinado en vacas de leche, sin la necesidad de detectar el estro. La mayoría de los protocolos de sincronización del estro se basan en la utilización de agentes luteolíticos, prostaglandinas o sus análogos sintéticos (Yániz *et al.*, 2004). Los tratamientos de sincronización del estro más recientemente desarrollados combinan diferentes hormonas que controlan la duración del ciclo éstrico y la dinámica folicular para conseguir una precisa sincronización del estro y una fertilidad normal tras una sola inseminación, independientemente de la situación de la vaca.

1.1.1 Tratamiento con prostaglandinas

Se ha demostrado ampliamente la capacidad de la PGF2alfa y de sus análogos sintéticos, alfaprostol, cloprostenol, fenprostalene y luprostiol de inducir la regresión de un cuerpo lúteo maduro en el ovario, y en consecuencia provocar y sincronizar el estro (Yániz *et al.*, 2004). Sin embargo, este efecto luteolítico no se observa en los primeros 5 días de vida del cuerpo lúteo y, en consecuencia, se ha desarrollado un protocolo doble, en el que la PGF2alfa se administra a intervalos de 7, 11 o 14 días, de manera que las vacas en una fase del ciclo éstrico diferente del diestro, hayan desarrollado un cuerpo lúteo funcional cuando reciben la segunda dosis de PGF2alfa. Numerosos autores han observado una fertilidad normal o por encima de lo normal tras la sincronización del estro con PGF2alfa en vacas inseminadas tras la detección del estro (Yániz *et al.*, 2004). Sin embargo, hay mucha controversia sobre los resultados de fertilidad tras la inseminación a tiempo pre-determinado. Esta variación se ha atribuido a las diferencias de intervalo entre el tratamiento con PGF2alfa y la ovulación. Para superar este problema se han desarrollado protocolos basados en la utilización de dos inseminaciones, realizadas a las 66-72 y 96-99 horas tras la segunda dosis de prostaglandina, pero los resultados son contradictorios.

1.1.2 Combinaciones de progesterona y prostaglandinas

Una de las mayores limitaciones de la utilización de prostaglandinas para sincronizar el estro en vacas de leche es su inactividad en vacas anoéstricas o no-cíclicas (Yániz *et al.*, 2004). La progesterona tiene la ventaja de que, además de mejorar la sincronización del estro, también induce el estro y la ovulación en una proporción aceptable de vacas anoéstricas. Tratamientos largos de progesterona (14 a 16 días) provocan una disminución de la fertilidad debido, al menos en parte, al desarrollo de folículos persistentes. Se han obtenido mejores resultados tras la utilización de tratamientos de corta duración (7 to 9 días) pero con una disminución de la sincronización del estro. Para que un tratamiento de corta duración con progesterona sea efectivo en la sincronización del estro, se debe combinar con un agente luteolítico, al aumentar la proporción de animales que necesitan una inducción exógena de luteolisis. Diversos trabajos sugieren una mejor respuesta a los tratamientos de sincronización del estro cuando la prostaglandina se administra 48 horas antes de la retirada del dispositivo vaginal liberador de progesterona.

Cuando se ha comparado la eficacia del tratamiento con prostaglandinas exclusivamente con el tratamiento que combina progestágenos y prostaglandinas, numerosos autores han mostrado una mayor sincronización del estro y fertilidad tras aplicar la combinación hormonal (Yániz *et al.*, 2004). Sin embargo, en el estudio de Murugavel *et al.* (2003), se obtuvieron mayores tasas de ovulación y más vacas gestantes cuando la concentración de progesterona era baja al inicio del tratamiento.

1.1.3 Combinaciones de prostaglandina, estrógeno y gonadotropina coriónica humana

En la vaca, se sabe que los estrógenos inducen un pico de LH semejante al preovulatorio, la ovulación y la actividad luteolítica durante la fase luteal (Yániz *et al.*, 2004). Estos efectos podrían justificar la inclusión del estradiol en diferentes protocolos de sincronización, aunque pueden existir restricciones legales a su utilización, como las de la Unión Europea, donde está prohibida su utilización. Utilizando como base la sincronización del estro con prostaglandinas, la ovulación se puede sincronizar eficazmente administrando benzoato de estradiol (BE) después del tratamiento con prostaglandinas en vacas y en novillas. También puede conseguirse una mayor sincronización del estro, sin afectar a la fertilidad, tras el tratamiento con benzoato de estradiol 40 a 48 horas tras el tratamiento con prostaglandinas. Por último, la combinación de estrógenos y prostaglandinas también puede permitir aumentar el porcentaje de vacas en estro.

La gonadotropina coriónica humana (hCG) ejerce una acción LH sobre las células ováricas que puede incluso inducir la ovulación a lo largo del ciclo éstrico. Combinando hCG, BE y PGF2alfa se desarrolló un protocolo de sincronización del estro y de la ovulación (López-Gatius, 2000). En este método se administra PGF2alfa tras palpar un cuerpo lúteo maduro, seguido de la administración de hCG y benzoato de estradiol 12 horas tras el tratamiento con prostaglandinas y de la inseminación a las 48h tras el inicio del tratamiento. Utilizando este protocolo, se obtuvieron unas tasas de gestación comparables a cuando se trataba a las vacas con prostaglandinas solamente y se inseminaba a la detección del estro o incluso a cuando se inseminaba a vacas con estro natural.

1.1.4 Combinaciones de GnRH y prostaglandinas

La administración de GnRH durante el ciclo éstrico induce un pico de LH, provoca la ovulación o la luteinización de grandes folículos presentes en el ovario, sincroniza el reclutamiento de nuevas oleadas foliculares, y sincroniza su desarrollo (Yániz *et al.*, 2004). La administración posterior de PGF2alfa provoca la regresión del cuerpo lúteo natural o inducido por la GnRH, y hace posible la maduración final del folículo dominante sincronizado. Aparentemente, el cuerpo lúteo inducido por la GnRH responde a la prostaglandina igual que un cuerpo lúteo espontáneo.

En esta combinación hormonal se basa el uno de los protocolos de sincronización del estro más conocidos, el Ovsynch, Timed artificial insemination (TAI) o GPG, que permite inseminar sin la necesidad de detectar el estro (Yániz *et al.*, 2004). En el método Ovsynch, se inyecta a ciegas 100 microgramos de GnRH durante el ciclo éstrico, seguido de 25 mg de PGF2alfa en el día 7 y una segunda dosis de 100 microgramos de GnRH 36 a 48 h después. La ovulación se sincroniza debido a que los folículos preovulatorios se encuentran en el mismo estadio de desarrollo

y son sensibles a la LH en el momento de la segunda inyección de GnRH. Este protocolo coordina el reclutamiento folicular, regresión del cuerpo lúteo y ovulación y permite la inseminación a las 16 horas tras la segunda dosis de GnRH.

Al contrario de lo descrito para la combinación de progesterona y prostaglandina, en el estudio de Murugavel *et al.* (2003), se obtuvieron mayores tasas de ovulación y más vacas gestantes cuando la concentración de progesterona era alta al inicio del tratamiento utilizando el Ovsynch, de donde se concluye que funciona mejor en vacas cíclicas.

También se ha demostrado que el éxito del protocolo Ovsynch viene condicionado con la fase del ciclo éstrico en la que se inicia el tratamiento (Yániz *et al.*, 2004). El momento ideal para iniciar el programa Ovsynch es la fase luteal temprana (días 5 a 12). Basándose en estos resultados, se han desarrollado protocolos de pre-sincronización de vacas utilizando dos dosis de prostaglandina separadas 14 días para iniciar el protocolo Ovsynch en la fase luteal temprana. Al protocolo conjunto lo denominaron Pre-synch. Los resultados demostraron un aumento de la proporción de vacas gestantes. La probabilidad de gestación se ve igualmente incrementada cuando el Ovsynch se inicia en el día 12 después de una sola administración de prostaglandina, dado que más vacas se encontrarán en el diestro temprano antes del comienzo del protocolo Ovsynch. Sin embargo, no se ha demostrado el efecto beneficioso de pre-sincronizar vacas en anoestro antes de iniciar el tratamiento Ovsynch, dada la ausencia de un cuerpo lúteo sensible a la prostaglandina.

1.1.5 Conclusiones

En los últimos años se han realizado avances significativos en la comprensión y regulación de los ciclos éstricos en vacas de leche. Sin embargo, los últimos métodos de sincronización del estro desarrollados todavía están lejos de un método único que permita una salida precisa del estro y una fertilidad normal tras la inseminación a tiempo pre-determinado, independientemente del estado endocrino u ovárico de cada animal al inicio del tratamiento. En la actualidad, la aplicación de métodos específicos de sincronización del estro, en función de la situación ovárica de la vaca en el postparto puede permitir mejorar la eficacia reproductiva de las vacas, en mayor medida que si las se aplica un solo método de sincronización, independientemente de la situación reproductiva de cada animal.

1.2 Inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) en vacuno se desarrolló comercialmente a principio de los años 30 del siglo pasado, y continúa siendo una técnica fundamental para la dispersión del material genético. La IA ha sido probablemente el mayor avance tecnológico en reproducción animal (López-Gatiús, 2012). En el año 2000, se estima que se comercializaron más de 100 millones de dosis seminales de toro en el mundo. Los principales motivos de este éxito han sido la mejora genética, el control sanitario y la rentabilidad de la IA, comparado con la monta natural. La IA ofrece muchas ventajas y pocas desventajas para las explotaciones lecheras, mientras que las dificultades para la detección del estro limitan su utilización en las explotaciones dedicadas a la producción de carne. Por ello son las explotaciones lecheras las que mejor han aprovechado los avances en la IA y las tecnologías seminales. La eficiencia de la inseminación depende, entre otros factores, de la deposición de un número suficiente de espermatozoides normales en el lugar adecuado del tracto genital de la vaca y en el momento justo del estro.

1.2.1 ¿Qué vacas inseminar?

Una vez detectado el estro, la confirmación del mismo por técnicos especializados capaces de reconocer los signos normales y anormales del aparato reproductor, aumentará sin duda la eficiencia reproductiva y la rentabilidad de las explotaciones (Roelofs *et al.*, 2010). La confirmación del estro permite la exclusión de vacas que se han clasificado erróneamente como listas para la inseminación. De hecho, es frecuente la identificación errónea e inseminación de vacas en estro cuando la concepción no puede ocurrir. La situación se ve aún más agravada por el hecho de que la inseminación de vacas gestantes puede provocar mortalidad embrionaria y aborto. La presencia de estro durante la gestación se ha descrito ampliamente y más del 40

Entre los métodos de confirmación del estro tenemos la exploración rectal del aparato reproductor mediante palpación o ecografía, y el examen del fluido vaginal. Una vaca se puede considerar como lista para el servicio cuando no se observa la presencia de cuerpos lúteos mayores de 10 mm en los ovarios, el folículo mayor es ligeramente blando al tacto y tiene un diámetro de 12 a 25 mm, el útero se muestra turgente y se contrae al tocarlo, y las descargas vaginales son abundantes, fluidas y transparentes (Roelofs *et al.*, 2010).

Por otro lado, el método de detección y confirmación del estro puede ayudarnos a predecir la fertilidad potencial de las vacas, y por tanto a elegir la dosis seminal más adecuada. Cuando la detección del estro se realiza mediante podómetros, hemos demostrado que existe una relación directa entre el grado de incremento de actividad locomotora, como indicador de la calidad del estro, y la fertilidad (Yániz *et al.*, 2003; López-Gatiús *et al.*, 2005). En un estudio reciente se ha demostrado

Para seguir leyendo haga click aquí