

RECOGIDA DE EMBRIONES DEL OVIDUCTO DE CERDAS SACRIFICADAS AL FINAL DE SU ETAPA PRODUCTIVA

Gadea^{1,2}, J., Crespo¹, S., García-Vazquez^{1,2}, F.A., Navarro-Serna^{1,2}, S., Romero-Aguirregomezcorta^{1,2}, J., Cánovas^{1,2}, S. y Romar^{1,2}, R.

¹Dept. Fisiología. Universidad de Murcia. Murcia 30.100 ²IMIB-Arrixaca; jgadea@um.es

INTRODUCCIÓN

La producción de cerdos modificados genéticamente mediante el empleo de técnicas Crispr-Cas puede realizarse mediante la inyección de sgARN en el citoplasma de embriones en estadio de 1 célula (zigoto) (Wang et al. 2015). Estos zigotos, que deben ser inyectados, pueden obtenerse mediante sistemas *in vitro* de producción de embriones (Whitworth et al. 2014), o bien ser recogidos *in vivo* del oviducto de cerdas previamente inseminadas, por procedimientos quirúrgicos o tras el sacrificio del animal en el matadero (Gadea et al. 2018; Petersen et al. 2016).

El uso de hembras sanas, con óptimo historial reproductivo, que se encuentran al final de su etapa productiva y son enviadas a matadero, por razones estratégicas o productivas de las empresas, pueden ser una fuente económica y eficiente de obtener embriones de buena calidad, minimizando los problemas éticos y legales que conlleva el uso de animales de experimentación. El objetivo del presente estudio fue estimar el rendimiento en la recogida de embriones en estadio de zigoto a partir de cerdas reproductoras de estas características inseminadas en granja tras un celo natural y sacrificadas en matadero 1-2 días post-inseminación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total 62 cerdas reproductoras de raza híbrida comercial, de 7-9 partos, procedentes de explotaciones de la Región de Murcia y repartidas 10 lotes diferentes. Se seleccionaron animales sanos, con buen historial reproductivo y destinados a matadero por razones estratégicas o productivas. Los animales, tras su último periodo de lactación, fueron destetados y salieron en celo de manera natural a los 3-4 días post-destete. Las cerdas en celo fueron inseminadas artificialmente con una única dosis de inseminación procedente de verracos de fertilidad probada y sacrificadas 24-48 horas después en el matadero.

Los tractos reproductivos de las hembras fueron recogidos en la cadena de faenado del matadero y los ovarios y oviductos se transportaron al laboratorio en una estufa a 38,5 °C en menos de una hora desde el sacrificio. En el laboratorio se mantuvo todo el material a 38,5 °C, se registró el estado del ovario contabilizando los cuerpos hemorrágicos presentes en el mismo, se procedió a la disección del oviducto y su posterior lavado con medio atemperado TL-HEPES-PVA (Funahashi et al. 2000). Bajo el estereomicroscopio se evaluó la presencia de embriones en el lavado y se determinó su estadio de desarrollo como zigotos (presencia de dos corpúsculos polares extruidos) y embriones de 2-4 células. Los ovocitos con un único corpúsculo polar visible en el espacio perivitelino se clasificaron como ovocitos no fecundados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectó actividad ovárica en un total de 55 de las 62 cerdas estudiadas (88,71%), observándose $23,24 \pm 0,85$ cuerpos hemorrágicos recientes por animal, correspondientes a puntos de ovulación, con una distribución similar entre ambos ovarios $11,58 \pm 0,54$ vs. $11,65 \pm 0,48$, $p > 0,05$. Estos resultados se sitúan dentro de los rangos normales para las líneas hiperprolíficas que se producen comercialmente en la actualidad (Foxcroft et al. 2009, Kraeling & Webel 2015). Del total de 55 cerdas con puntos de ovulación, se obtuvieron embriones en 48 de ellas (87,27%), con una media de $16,23 \pm 1,20$ embriones totales/animal, por lo que la tasa de recogida media de embriones fue del 70,62%. Mientras que 4 cerdas con puntos de ovulación no se pudieron recoger embriones (7,27%) y en las 3 restantes se recogieron ovocitos no fecundados (5,45%).

En cuanto al estadio de desarrollo de los embriones obtenidos por animal la distribución fue de $11,42 \pm 1,23$ zigotos, $4,35 \pm 1,18$ embriones de 2-4 células y $0,46 \pm 0,23$ correspondieron a embriones degenerados o rotos.

La recogida y uso de embriones producidos *in vivo* aporta la ventaja, frente a los producidos *in vitro*, de presentar una mejor calidad en términos de tasa de desarrollo embrionario, número

medio de células por blastocisto y diferente patrón epigenético (Cánovas et al. 2017). Además, la obtención de embriones producidos *in vivo* requiere de equipamiento y técnicas más sencillas que en la producción *in vitro*, y permite conocer el origen paterno y materno del embrión. Por el contrario, la obtención de embriones *in vivo* requiere de una buena coordinación con las granjas, la correcta identificación de los animales de interés para su seguimiento en la cadena de faenado del matadero y un menor número de embriones recogidos por sesión de trabajo. Así pues, en una sesión de trabajo con material *in vivo* se pueden recoger embriones de 6 animales que podrían producir 60-70 zigotos, mientras que en una única sesión de fecundación *in vitro* se pueden inseminar fácilmente hasta 600 ovocitos que pueden producir unos 150-200 zigotos viables (Ver comunicación Navarro-Serna et al.).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cánovas et al. 2017. DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids. *eLife* 6, e23670 • Foxcroft G et al 2009 Prenatal programming of postnatal development in the pig. *Soc Reprod Fertil Suppl* 66 213-231. • Funahashi et al. 2000. Zona reaction in porcine oocytes fertilized *in vivo* and *in vitro* as seen with scanning electron microscopy. *Biol Reprod* 63 1437-1442. • Gadea et al. 2018. Generation of TPC2 knock out pig embryos by CRISPR-Cas technology. • Reprod Dom Anim 53 87-88. Kraeling & Webel 2015 Current strategies for reproductive management of gilts and sows in North America. *J Anim Sci Biotechnol* 6 3. Petersen et al. 2016 Efficient production of biallelic GGTA1 knockout pigs by cytoplasmic microinjection of CRISPR/Cas9 into zygotes. *Xenotransplantation* 23 338-346. • Wang et al. 2015. Efficient CRISPR/Cas9-mediated biallelic gene disruption and site-specific knockin after rapid selection of highly active sgRNAs in pigs. *Sci Rep* 5 13348. • Whitworth et al. 2014. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from *in vitro*-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod* 91 78.

Agradecimientos: Proyectos MINECO AGL2015- 66341-R y Fundación Seneca Región de Murcia 20040/GERM/16.

EMBRYO RECOVERY FROM THE OVIDUCT OF SOWS SLAUGHTERED AT THE END OF THEIR PRODUCTION STAGE

Porcine zygotes necessary to produce transgenic animals by Cripsr-Cas technology can be obtained from healthy animals with an optimal reproductive background which are discarded for market reasons at the end of their productive life. Here it is estimated the performance in the collection of zygotes from sows with the afore mentioned characteristics. Sixty-two sows (commercial hybrid), with 7-9 farrowing were selected. Animals showing heat at 3-4 days post-weaning were inseminated with a single dose and slaughtered 24-28h post-insemination. The ovaries-oviducts from each animal were collected and transported to the laboratory at 38.5 °C within one hour. Hemorrhagic points in each ovary were recorded and oviduct flushed with tempered TL-HEPES-PVA medium. Under the stereomicroscope, the embryos were collected and classified as nonfertilized oocytes (one polar body), zygotes (two polar bodies extruded) and 2-4 cell embryo. Results showed that 88.71% of sows had ovulated presenting 23.24 hemorrhagic points/animal and similar distribution per ovary (11.58 vs. 11.65). Embryos were recovered in 87.27% of animals with 16.23 embryo/animal (11.42 zygotes, 4.35 2-4 cell embryo and 0.46 degenerated or broken) and 70.62% recovery rate. In 7.27% of sows with ovulation activity no embryos were collected and 5.45% had non fertilized oocytes.

Keywords: ovulation, embryo, recovery, efficiency, pig