

EFICIENCIA DE LA RECUPERACIÓN *IN VIVO* DE EMBRIONES DE CONEJO POR LAPAROSCOPIA.

Lavara R.^a, Viudes De Castro M.P.^b, Mehaisen G.M.K.^a, Vicente J.S.^a

^aLaboratorio de Biotecnología de la Reproducción. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia. Cno de Vera 14. C.P. 46071-Valencia. España.

^bCITA, IVIA Moncada, España. E-mail: rlavara@dca.upv.es

INTRODUCCIÓN

Los programas de crioconservación de embriones de conejo desarrollados en la década de los 90 en el INRA y la UPV han permitido tanto constituir o re-establecer poblaciones control para poder evaluar la respuesta a la selección (García y Baselga 2002) como poder llevar a cabo la difusión de material genético a otros países sin riesgos de transmisión de enfermedades (García et al. 2000) o la preservación de recursos genéticos animales (Bolet et al. 2000).

La recuperación de embriones en el marco de un programa de crioconservación pretende no sólo obtener un elevado número de embriones, sino además que éstos provengan del mayor número de orígenes macho y hembra, con el fin de obtener una adecuada representación de la población original. La recuperación de embriones de conejo, en general, se realiza tras el sacrificio de una hembra donante (post-mortem) que puede haber sido inducida a superovular con eCG o FSH. Si bien estos tratamientos consiguen aumentar el número total de embriones recuperados, presentan desventajas, así, el 30-40% de las donantes muestran fallos de recuperación (Renard et al. 1992; García y Vicente, 1990), baja calidad y viabilidad de los embriones (Illera et al. 1990, Mehaisen et al. 2003), y cuando se aplica sobre estirpes o razas no habituales (Turingia, Chinchilla o Leonado de Borgoña) los fallos de respuesta ovárica, fecundación o desarrollo embrionario son aún más elevados.

Una técnica que mejora el número de embriones recuperados por hembra es la recuperación *in vivo* de embriones, bien por laparotomía (Forcada y López 2000) o por laparoscopia (Besenfelder et al. 1998), ya que permiten recuperar varias dotaciones de embriones de una misma hembra.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia de la técnica de recuperación de embriones *in vivo* por laparoscopia en tres líneas seleccionadas de conejo, y su posible repercusión en el futuro reproductivo de la hembra.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Como donantes de embriones se utilizaron 70 hembras multiparas lactantes con al menos dos partos. Las conejas pertenecían a las líneas A (n=16) y V (n=22) seleccionadas por tamaño de camada al destete (Estany et al. 1989) y a la línea R (n=32), seleccionada por velocidad de crecimiento (Estany et al. 1992).

Las hembras se cubrieron con machos adultos de la misma línea y generación con los que no estuviesen emparentados.

Los embriones fueron recuperados mediante laparoscopia 76-78 horas tras la monta o inseminación. Una vez anestesiada la hembra y distendido el abdomen, se prepara el campo de intervención que a diferencia de la laparotomía, se restringe a tres pequeñas zonas localizadas, dos caudales cerca de la región inguinal (una para cada oviducto) por la que se introduce la sonda de perfusión, y dos centrales a 6-8 cm respecto al extremo del esternón. En estas zonas se practican las punciones con los trócares y vainas correspondientes al endoscopio y al fórceps atraumático. Una vez realizadas las punciones se introduce el catéter de perfusión por la abertura

infundibular y se lava el oviducto con 5 ml de medio de perfusión (Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) con antibióticos (Penivet 1, Difarma)) empujando el contenido del mismo hacia el cuerno uterino. Tras la perfusión de los oviductos, se perfunde cada uno de los cuernos uterinos con 50 ml de medio y su contenido es recogido del fondo de la vagina con un catéter de Foley conectado a una bomba de aspiración.

Para valorar la incidencia de la recuperación de embriones *in vivo* sobre el futuro reproductivo de la hembra donante tras la recuperación, se controlaron un total de 93 partos de las 70 hembras donantes, registrándose los datos de: índice intentos-servicios (%), número de nacidos totales (NT) y número de nacidos vivos (NV). Se estableció un grupo control de hembras multíparas lactantes de la misma línea y generación, controlándose un total de 238 partos de 97 hembras control (47, 40 y 20 hembras de las líneas A, V y R, respectivamente) de los que se tomaron los mismos datos que para el grupo recuperado *in vivo*.

En el momento de la recuperación se observó la tasa de ovulación (TO), tras la perfusión de oviductos y de útero se procedió al recuento de la tasa de recuperación global [formada por el conjunto de oocitos, embriones normales y anormales (TR)], embriones totales recuperados (ER) y embriones normales recuperados (EN). Los embriones recuperados fueron catalogados basándose en criterios morfológicos, considerándose embriones normales aquellos embriones en estadio de mórula compactada (MOR) o blastocisto temprano (BLAS) que presentaban una masa de células homogénea y ninguna anomalía en la cubierta de mucina y zona pelúcida.

En las hembras donantes se analizó el efecto de la línea sobre la TO, éxito de la recuperación (TR/TO), tasa de normalidad embrionaria (EN/TR), embriones normales (EN), porcentaje de mórulas (MOR/EN) y porcentaje de blastocistos (BLAS/EN), mediante un GLM (General Línear Model). Se utilizó el mismo modelo estadístico para analizar el efecto del tratamiento (recuperación *in vivo*, control) y la línea, así como su interacción, sobre el índice de intentos-servicios (%), nacidos vivos (NV) y nacidos totales (NT).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron un total de 70 recuperaciones *in vivo*, de las cuales 16 se realizaron sobre hembras A, 22 sobre hembras V y 32 sobre hembras R. Los resultados de la recuperación se muestran en la tabla de resultados (Tabla 1).

TABLA 1: Recuperaciones *in vivo* de embriones en las tres líneas de la UPV.

	TO	TR	TR/TO (%)	EN	EN/TR (%)	MOR/EN (%)	BLAS/EN (%)
A	10.5±0.59 ^b (16)	8,2±0.98 (16)	77.4%±7.9 (16)	7.3±1.15 (16)	87%±9.8 (16)	71%±8.8 ^{ab} (15)	22%±7.1 ^b (15)
V	11.5±0.50 ^b (22)	7.3±0.84 (22)	67%±5.6 (22)	6.5±1.0 (20)	75%±8.7 (20)	49%±8.6 ^c (20)	46%±6.9 ^a (20)
R	12.4±0.42 ^a (32)	8.3±0.70 (32)	64%±6.8 (32)	6.1±0.83 (31)	66%±7.0 (31)	89%±7.2 ^a (31)	2%±5.7 ^c (31)
TOTAL	11.5±0.29 (70)	7.9±0.49 (70)	69%±3.9 (70)	6.6±0.58 (67)	76%±4.9 (67)	70%±4.7 (66)	23%±3.8 (66)

Columnas con distinto superíndice muestran diferencias significativas (P<0.05)

TO: Tasa de ovulación, TR: Tasa de recuperación global, TR/TO: porcentaje de recuperación global, EN: Número de embriones normales; EN/TR (%): porcentaje de normalidad; MOR/EN (%): porcentaje de mórulas; BLAS/EN (%): porcentaje de blastocistos.

Se observaron diferencias significativas para la TO, entre las tres líneas, la línea R, debido a su mayor peso vivo (línea seleccionada por velocidad de crecimiento e índice de conversión) tiene una TO mayor (12,4 frente 10,5 y 11,5 para las líneas R, A y V, respectivamente $P<0.05$). También se observaron diferencias en el desarrollo embrionario para las distintas líneas [MOR/EN (%), BLAST/EN(%)], mostrando la línea V, un desarrollo embrionario más temprano que las líneas A y R (46% BLAST/EN frente a 22% y 2% para las líneas V, A y R respectivamente, $P<0.05$). Si comparamos los resultados obtenidos con la recuperación de embriones *in vivo*, con los resultados obtenidos con la recuperación post-mortem de embriones para estas mismas líneas (Lavara et al. 2001), se observa que la tasa de recuperación global es semejante (77% frente a 77.4%; 68% frente a 64%; para recuperación post-mortem e *in vivo* en las líneas A y R).

Tabla 2. Incidencia de la recuperación in vivo de embriones sobre las características reproductivas futuras de la hembra.

	I-S (%)	NT	NV
CONTROL	53%±7.5 (238)	8.84±0.25 (238)	8.02±0.27 (238)
IN VIVO	52%±10.5 (91)	8.28±0.35 (91)	7.58±0.38 (91)
TOTAL	53%±6.5 (329)	8.56±0.21 (329)	7.79±0.24 (329)

I-S(%): índice intentos-servicios. NT: nacidos totales por parto; NV: nacidos vivos por parto.

No se observaron diferencias significativas entre el índice intentos-servicios (%), NT y NV, entre los grupos control e *in vivo* (Tabla 2). Tampoco resultó significativa la interacción línea*tratamiento.

De los resultados obtenidos se concluye que la metodología de recuperación de embriones *in vivo* descrita puede ser utilizada para obtener embriones de hembras que se encuentren en producción, sin necesidad de ser sacrificadas y sin afectarlas reproductivamente, lo que implicaría poder obtener un mayor número de embriones (tras varias intervenciones) de un gran número de hembras teniendo de esta forma asegurada la variabilidad de la población una vez se produzca su reconstitución futura.

Este estudio ha sido financiado por el proyecto de C.I.C.Y.T. AGL2000-0595-C03-01

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BESENFELDER U., STROUHAL C., BREM G. 1998. J. Vet. Med. A. 45, 577-579.
BOLET G. et al. 2000. 7th World Rabbit Congress. Vol. A: 231-316.
ESTANY J., BASELGA M., BLASCO A., CAMACHO J. 1989. Livest. Prod. Sci. 21: 67-75.
ESTANY J., CAMACHO J., BASELGA M., BLASCO A. 1992. Génét. Sél. Evol. 24:527-537.
FORCADA F., LOPEZ M. 2000. Anim. Reprod. Sci. 64: 121-126
GARCIA M.L., BASELGA M. 2002. Livest. Prod. Sci. (74) 45-53
GARCIA M.L.; BLUMETTO O.; CARPA G.; VICENTE J.S.; BASELGA M. 2000. 7th World Rabbit Congress. Vol (A) 139-142.
GARCÍA F., VICENTE J.S., 1990. J. Appl. Rabbit Res., 13 (2) :71-73.
ILLERA M.J., RODRIGUEZ DE SADIA C., MUÑOZ I., ILLERA M. 1990. Theriogenology 33, 253 (Abstract).
LAVARA R., MOCÉ L., MOCÉ E., GARCÍA M.L., VICENTE J.S. 2001. III Congreso Ibérico Reproducción Animal. 409-414.
MEHAISEN GMK., LAVARA R., VICENTE JS. 2003. X Jornadas producción animal. Vol. 1: 294-296.
RENARD J.P., GARNIER V., PARVEX R., 1992. 3^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, Paris. Communication n° 18.