

## **EFFECTO DE LA LÍNEA GENÉTICA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PROGESTERONA, 17 $\beta$ -ESTRADIOL, IGF-I Y LA PÉRDIDA EMBRIONARIA Y FETAL DURANTE LA GESTACIÓN EN CONEJO**

Llobat, L.<sup>1</sup>, Marco-Jiménez, F.<sup>1</sup>, Lavara, R.<sup>1</sup>, Viudes-de-Castro, M.P.<sup>2</sup>, Baselga, M.<sup>1</sup> y Vicente J.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, 46022-Valencia. España.

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Tecnología Animal, IVIA. 12400-Segorbe (Castellón). España.  
E-mail: mallobor@upvnet.upv.es

### **INTRODUCCIÓN**

En conejo se ha estimado que la mortalidad embrionaria hasta el inicio de la implantación es del 10 al 14% y la fetal (entre la implantación y el parto) está en torno al 20-22% (Adams, 1960; Santacreu et al., 2000 y 2005). La línea seleccionada por velocidad de crecimiento (línea R) presenta tasas de ovulación (13-14,4) y tasas de fecundación similares a líneas seleccionadas por tamaño de camada (Vicente et al., 2003; Mehaisen et al., 2005) pero un tamaño de camada bajo (en torno a 7) lo que supone unas pérdidas totales durante la gestación próximas al 50%. Dado que el reducido tamaño de camada no es consecuencia de una menor tasa de ovulación o fecundación, su baja eficiencia reproductiva podría estar condicionada por problemas en el desarrollo embrionario tardío y/o los procesos de implantación, placentación y desarrollo fetal, en los que tanto el genotipo embrionario como el materno deben interactuar y responder. En estos procesos son fundamentales factores endocrinos como el estradiol, la progesterona, los factores de crecimiento como IGF-I y II, prostaglandinas y/o los interferones que favorecen el desarrollo embrionario y uterino que promueve la implantación, placentación y el mantenimiento de la gestación (Crossey et al., 2002; Spencer et al., 2004; Seshagiri et al., 2009). El objetivo del presente trabajo fue caracterizar las pérdidas gestacionales de la línea R seleccionada por incremento de peso durante el cebo en relación con una línea seleccionada A por tamaño de camada, además de conocer los niveles sanguíneos de tres importantes factores endocrinos relacionados con la eficiencia reproductiva (progesterona, 17 $\beta$ -estradiol e IGF-I).

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se utilizaron hembras pertenecientes a dos líneas de selección, la línea A de origen Neozelandés blanco seleccionada desde 1980 por tamaño de camada al destete mediante un índice de selección familiar, y la línea sintética R seleccionada desde 1992 por crecimiento post-destete (28-63 días, Estany et al., 1992).

A los 12 días post-monta un total de 54 conejas multiparas gestantes, tanto lactantes (34) como no lactantes (20), fueron laparoscopizadas con el fin de cuantificar la tasa de ovulación y el número de embriones implantados.

En el momento de la laparoscopia se extrajo sangre de la arteria central de la oreja mediante un tubo Vacutainer heparinizado. Posteriormente, estos tubos se centrifugaron a 3000xg durante 10 minutos y a una temperatura de 4°C con el fin de separar el plasma, que se congeló a -80°C hasta su posterior análisis.

Los niveles séricos de progesterona, 17 $\beta$ -estradiol y factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I) se midieron mediante técnica ELISA de ensayo directo, utilizando tres kits comerciales (Rabbit Progesterone Elisa Test, Endocrine Technologies, Inc. Newark, EEUU; IGF-I Elisa Kit, Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Texas, EEUU; y Estradiol Elisa Ultra Sensitive Kit, DRG International, Inc. Marburg, Alemania). La sensibilidad de los test utilizados fue de 0,1 ng/mL para la progesterona, 1,4 pg/ml para el 17 $\beta$ -estradiol y de 1,1 ng/ml para el IGF-I.

Las variables a estudiar han sido: la tasa de ovulación, las pérdidas a 12 días (expresado como el porcentaje de la tasa de ovulación menos embriones implantados a 12 días/tasa de ovulación), las pérdidas entre 12 días de gestación y parto (expresado como el porcentaje de embriones implantados menos los nacidos totales/embriones implantados), las pérdidas durante la gestación (expresado como el porcentaje de la tasa de ovulación menos los nacidos totales/tasa de ovulación), los nacidos totales (número de gazapos vivos más muertos al parto) y los niveles de progesterona, 17 $\beta$ -estradiol e IGF-I en el día 12 gestación. El modelo estadístico utilizado fue un modelo lineal general que incluyó los efectos fijos de la

línea genética (A y R), el estado de lactación en el momento de la cubrición (lactante o no lactante) y su interacción, incluyendo para los análisis endocrinos el número de embriones implantados a 12 días como covariable.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pérdidas, calculadas en base a la tasa de ovulación a 12 días y en base a los nacidos totales en el momento del parto, fueron significativamente mayores para la línea R que para la línea A (Tabla 1), porcentajes estos últimos similares a los observados por otros autores que cifran las pérdidas gestacionales (embrionarias y fetales) en torno al 30% (Adams, 1960; Santacreu *et al.*, 2000; García, 2001). La línea R muestra una elevada mortalidad que afecta tanto a la fase embrionaria, lo que podría suponer problemas en el desarrollo embrionario y en el diálogo embrión-madre, como a la capacidad del feto y de la madre para sostener su desarrollo, lo que conlleva un menor tamaño de camada. El estado de lactación únicamente afectó a la tasa de ovulación, siendo las lactantes las que presentan una mayor tasa de ovulación (Tabla 1), resultado similar al de Fortun-Lamothe y Prunier (1999) y Mocé (2003), que se relacionan con un mayor número de folículos y nivel de estradiol necesarios para desencadenar la ovulación en estas hembras. En ningún caso la interacción línea-estado de lactación resultó significativa.

De los factores endocrinos estudiados, el nivel de progesterona fue similar entre las líneas, resultado acorde con los obtenidos por otros autores para este momento de la gestación (Browning *et al.*, 1980; López *et al.*, 1993; Mocé, 2003). No obstante, los niveles de  $17\beta$ -estradiol difirieron entre ambas líneas, siendo la línea de crecimiento (R) la que muestra una menor concentración. Dado que el estradiol en conejo es considerado como el factor luteotrófico primario (Miller y Keyes, 1975:1978; Niswender *et al.*, 2000), esta menor concentración podría condicionar la actividad de los cuerpos lúteos y ser una de las causas de la elevada mortalidad fetal. Si bien, es cierto que el nivel de progesterona desciende desde el día 12 de gestación en el conejo (Browning *et al.*, 1980), será necesario establecer el perfil endocrino en la línea R para establecer si existe un descenso más acusado que en otras con menores mortalidades fetales. En ningún caso la covariable embriones implantados resultó significativa.

Los niveles séricos de IGF-I fueron distintos tanto entre líneas como entre estados de lactación, siendo mayores en la línea de crecimiento y en las hembras lactantes. Este factor está relacionado con el crecimiento y el metabolismo energético, y a nivel reproductivo se le relaciona con el desarrollo folicular, mantenimiento de la actividad luteal (Niswender *et al.*, 2000), desarrollo embrionario y fetal, y con el desarrollo de la glándula mamaria (Hadsell *et al.*, 2002). Las hembras multiparas lactantes en el momento de la laparoscopia, se encontraban en la tercera semana de lactación, lo que implica una elevada demanda nutricional por parte de los lactantes, el mantenimiento de la estructura uterina, además de haber iniciado el proceso de placentación y desarrollo fetal, lo que podría justificar la diferencia observada. Sin embargo, las diferencias entre las líneas podrían ser debidas a su ingesta, ya que la línea de crecimiento necesita niveles basales de IGF-I mayores para mantener su actividad metabólica y esto podría estar relacionado con patrones de secreción anormales de sus receptores o de la propia insulina (Brockmann *et al.*, 2001). En conclusión, la línea seleccionada por incremento de peso durante el cebo muestra patrones de pérdidas gestacionales y endocrinos diferenciales en relación a la línea seleccionada por tamaño de camada.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, C.E. 1960. *J Reprod Fertil* 1: 36-44. • Brockmann, G. A., Haley, C. S., Wolf, E., Karle, S., Kratzsch, J., Renne, U., Schwerin, M., Hoeflich, A. 2001. *FASEB J* 15: 978-987. • Browning, J. Y., Keyes, P. L., Wolf, R. C. 1980. *Biol Reprod* 23: 1014-1019. • Crossey, P. A., Pillai, C. C., Miell, J. P. 2002. *J Clin Invest* 110 (3): 411-418. • Estany, J., Camacho, J., Baselga, M., Blasco, A. 1992. *Genet Sel Evol* 24: 527-537. • Fortun-Lamothe, L., Prunier, A. 1999. *Anim Reprod Sci* 55: 289-298 • García, M. L. 2001. *Tesis doctoral. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. España.* • Hadsell, D. L., Bonnette, S. G., Lee, A. V. 2002. *J Dairy Sci* 85: 365-377. • López, M., Forcada, F., Rodríguez, J. A., Martín, M., Zaragaza, L. 1993. *World Rabbit Sci* 1(4): 127-132. • Mehaisen, G. K. M., Viudes-de-Castro, M. P., Vicente, J. S., Lavara, R. 2005. *Theriogenology* 65: 1279-

1291. • Miller, J. B., Keyes, P. L. 1975. *Endocrinology* 102(1): 31-38. • Miller, J. B., Keyes, P. L. 1978. *Endocrinology* 97(1): 83-90. • Mocé, M. L. 2003. *Tesis doctoral. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. España.* • Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K., McIntush, E. W. 2000. *Physiol Rev* 80: 1-2. • Santacreu, M. A., Argente, M. J., Mocé, M. L., Blasco, A. 2000. *Proc. 7<sup>th</sup> World Rabbit Congress, Valencia, España.* Vol A: 491-495. • Santacreu, M. A., Mocé, M. L., Climent, A., Blasco, A. 2005. *J Anim Sci* 83: 2303-2307. • Seshagiri, P. B., Sen Roy, S., Sireesha, G., Rao, R. P. 2009. *J Reprod Immunol* 83(1-2): 79-84. • Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W., Burghardt, R. C. 2004. *Reproduction* 28(6): 657-668. • Vicente, J. S., Viudes-de-Castro, M. P., García M. L., Baselga, M. 2003. *Reprod Nutr Dev* 43(2): 137-143.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por AGL2008-03274/GAN.

**Tabla 1.** Pérdidas durante la gestación y niveles de progesterona, 17 $\beta$ -estradiol e IGF-I a día 12 de gestación en la líneas de conejo A y R.

Factor	Tasa de ovulación	Porcentaje de pérdidas			Nacidos Totales	Progesterona (ng/ml)	Estradiol (pg/ml)	IGF-I (ng/ml)
		a 12 días	día 12 a parto	Gestación				
Línea								
Línea A	12,8 $\pm$ 0,74	10,7 $\pm$ 3,94 <sup>b</sup>	19,4 $\pm$ 4,96	28,0 $\pm$ 5,11 <sup>b</sup>	10,1 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	10,0 $\pm$ 1,63	26,5 $\pm$ 2,73 <sup>a</sup>	141 $\pm$ 23,8 <sup>b</sup>
(n)	(27)	(27)	(27)	(27)	(27)	(27)	(26)	(27)
Línea R	13,5 $\pm$ 0,71	23,1 $\pm$ 3,79 <sup>a</sup>	30,6 $\pm$ 4,90	47,7 $\pm$ 4,90 <sup>a</sup>	7,2 $\pm$ 0,72 <sup>b</sup>	10,5 $\pm$ 1,56	14,6 $\pm$ 2,78 <sup>b</sup>	241 $\pm$ 23,8 <sup>a</sup>
(n)	(27)	(27)	(27)	(27)	(27)	(27)	(24)	(25)
Estado								
Lactante	14,5 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	13,3 $\pm$ 3,32	27,0 $\pm$ 4,18	36,6 $\pm$ 4,30	9,2 $\pm$ 0,63	11,1 $\pm$ 1,37	21,8 $\pm$ 2,34	228 $\pm$ 20,4 <sup>a</sup>
(n)	(34)	(34)	(34)	(34)	(34)	(34)	(32)	(32)
No lactante	11,8 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>	20,5 $\pm$ 4,34	22,9 $\pm$ 5,59	39,1 $\pm$ 5,62	8,2 $\pm$ 0,83	9,4 $\pm$ 1,79	19,3 $\pm$ 3,12	156 $\pm$ 26,8 <sup>b</sup>
(n)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(18)	(20)

Valores en cada columna con diferente superíndice difieren estadísticamente P<0,05.

n: número de conejas. Los valores se muestran como medias ajustadas por mínimos cuadrados  $\pm$  error estándar.

### EFFECT OF RABBIT GENETIC LINE ON PROGESTERONE, 17 $\beta$ -ESTRADIOL, IGF-I SERUM LEVELS AND GESTATIONAL LOSSES

**ABSTRACT:** The most probably cause of embryonic loss is an abnormal embryonic development which hampers its implantation. However, when losses are after implantation, they are due to placental development motivated by fetus and maternal response to it. The aim of this work was to characterize gestational losses in growth line (R) respect to a selected line for litter size (A). Moreover, it focuses on the endocrine level of three important endocrine factors related to reproductive efficiency. Losses calculated in base to ovulation rate at day 12 and at birth were significant higher for line R than for line A, being 23.1% and 47.7% vs. 10.7% and 28.0% respectively. For endocrine factors, progesterone level was similar between lines and according to results of other authors at this moment of gestation. However, 17 $\beta$ -estradiol differed between lines, being the line R the one which shows minor concentration. Due to estradiol is a primary lutetrophic factor in rabbits, it might affect corpora lutea and be the cause of fetal mortality. Furthermore, differences observed in IGF-I were favorable to line R. In conclusion, growth line shows gestational losses and endocrine factors different to the selected line for litter size.

**Keywords:** Foetal, endocrine levels, genetic line, rabbit.