

RESPUESTA DE CONEJAS NULÍPARAS Y MULTÍPARAS A LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA CON CORIFOLITROPINA ALFA Y SU EFECTO SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TRAS LA CRIOPRESERVACIÓN

Juarez, J.D.¹, García-Domínguez, X.¹, Talaván, A. M.¹, Vicente, J.S.¹, Marco-Jiménez, F.¹, Viudes de Castro, M.P.²

¹Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia

²Centro de Investigación y Tecnología Animal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Segorbe (Castellón).
viudes_mar@gva.es

INTRODUCCIÓN

La críoconservación permite el establecimiento de bancos de recursos genéticos para facilitar la difusión, preservar y mantener la variabilidad genética. Si bien, el establecimiento de estos bancos, y más concretamente de los de embriones, dependen de la optimización de la recuperación de los embriones, su críoconservación y su posterior transferencia para generar descendencia. Así, y como primer paso, la utilización de la superovulación permite maximizar el número de embriones transferibles por donante, ya sea para apoyar los programas de mejora genética, la conservación *ex situ* o bien para optimizar otras biotecnologías. En este sentido, aumentar el número de embriones por donante permite mejorar la eficiencia de la difusión genética (Takeo y Nagata, 2015) y reducir el número de animales utilizados. No obstante, la efectividad de los tratamientos de superovulación con eCG y FSH hipofisarias o recombinantes depende de si son capaces de sostener el desarrollo antral de los folículos y reducir los procesos de atresia derivados del mismo. Sin embargo, en muchas ocasiones la calidad de los óvulos y embriones se ve afectada, ya que los tratamientos con una u otra gonadotropina no son capaces de mimetizar las necesidades de este proceso. De estas gonadotropinas, la FSH es la más eficiente, pero su corta vida media y la rápida eliminación metabólica conllevan una aplicación cada doce horas o su administración con polímeros como coadyuvantes para incrementar ligeramente su biodisponibilidad, lo que supone un aumento del manejo de las donantes, así como la posibilidad de errores en la administración de los tratamientos. La introducción de la corifolitropina alfa, una FSH recombinante de acción prolongada, permite simplificar los protocolos de superovulación, reduciendo el número de inyecciones y, en consecuencia, mejorando el manejo de las donantes (Duijkers et al., 2002; Devroey et al., 2004). Por otra parte, uno de los factores intrínsecos que más puede contribuir a la variabilidad de la respuesta superovulatoria es la hembra donante. El efecto de la edad de la donante sobre la respuesta a la superovulación es un aspecto que casi siempre se ignora, pero que sin embargo podría contribuir en gran medida a la variación en la respuesta superovulatoria entre animales dentro del mismo grupo. En caprino y ovino se ha observado que las hembras jóvenes tienen una menor respuesta a la superovulación que las hembras adultas (Rangel-Santos et al., 1991; Lehloeny y Greyling, 2010), mientras que la respuesta superovulatoria no se ve afectada en vacuno (Lima et al., 2007). En conejo se ha demostrado que la utilización de corifolitropina alfa en una única dosis 60h antes de inducir la ovulación proporciona respuesta superovulatoria en conejas nulíparas sin merma de la viabilidad embrionaria (Viudes de Castro et al., 2017; Vicente et al., 2018). No obstante, en muchas ocasiones es necesario incorporar al banco embriones de conejas multíparas al finalizar el proceso de selección, por lo que sería necesario estudiar la respuesta superovulatoria y la viabilidad de los embriones obtenidos de este tipo de hembras. El objetivo específico de este estudio fue determinar la respuesta superovulatoria de hembras nulíparas y multíparas a un tratamiento de corifolitropina alfa y evaluar el desarrollo de los embriones tras un proceso de críoconservación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron dos tipos de hembras, 25 nulíparas de 19-20 semanas de edad y 25 multíparas (con seis partos). Todas ellas de origen neozelandés, seleccionadas por tamaño de camada al destete. Las conejas se alojaron en jaulas tipo flat-deck, recibieron una dieta estándar *ad libitum* y tenían acceso libre al agua. A lo largo de todo el experimento se utilizó un ciclo lumínico que alternaba 16 h de luz y 8 h de oscuridad. La estimulación ovárica se indujo

subcutáneamente con 3 µg de corifolitropina alfa (Elonva, Merck Sharp & Dohme S.A.; España). Transcurridas 60 h desde su aplicación, todas las hembras fueron inseminadas con 1 mL de una mezcla heteroespérmica proveniente de machos de probada fertilidad de la misma línea genética que las hembras y la ovulación fue inducida con 1 µg de acetato de buserelina (Suprefact; Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, España) aplicado intramuscularmente. A las 72 h tras la inseminación, las hembras fueron eutanasiadas con una inyección intravenosa de 0,6 g de pentobarbital sódico (Dolethal; Vetoquinol, Madrid, España). Los embriones fueron recuperados mediante perfusión de los cuernos uterinos con 10 mL de DPBS (tampón fosfato salino Dulbecco) suplementado con 0.2% de albúmina sérica bovina (AMRESCO; Solon, EEUU), 0,133 g/L CaCl₂, 0,100 g/L MgCl₂ y antibióticos (100 UI/mL Penicilina y 0,01 mg/mL estreptomina, Sigma-Aldrich Química S.A., España). Sólo aquellos embriones en estadio de mórula o blastocisto temprano, que presentaban una masa celular homogénea y esférica y que estaban recubiertos por una capa de mucina y una zona pelúcida intactas fueron catalogados como embriones normales, siguiendo los criterios morfológicos de clasificación de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS). Los embriones fueron vitrificados y desvitrificados siguiendo la metodología descrita por Vicente et al. (1999). Tras la desvitrificación, los embriones fueron cultivados durante 48 h en TCM 199 suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 100 IU/mL Penicilina y 0,01 mg/mL de Streptomina (Sigma-Aldrich Química S.A., España) a 38,5°C, 5% de CO₂ y con atmósfera saturada de humedad. Se registró la capacidad de alcanzar el estadio de blastocisto expandido y escapado de los embriones. La tasa de ovulación, el número de embriones recuperados, el número de embriones normales y anormales fueron analizados mediante un ANOVA, con el tipo de hembra (nulípara o múltipara) como factor fijo. La inducción de la ovulación, la tasa de blastocistos expandidos y la tasa de blastocistos escapados fueron analizadas mediante una función probit link con distribución binomial del error, con el tipo de hembra (nulípara o múltipara) como factor fijo. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS (SPSS 21.0 software package; SPSS Inc., 2002, Chicago, IL, EEUU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento de estimulación ovárica con corifolitropina alfa tuvo una respuesta superovulatoria en todas las hembras que fueron inducidas a ovular. Los resultados del tipo de hembra (nulípara o múltipara) sobre las variables de recuperación obtenidos se muestran en la Tabla 1. Se observó que el tipo de hembra no afectaba a la inducción a la ovulación, no obstante, los valores obtenidos de tasa de ovulación, número de embriones recuperados y número de embriones normales fueron significativamente superiores en el grupo de hembras nulíparas, resultados que contrastan con lo observado por Rangel-Santos et al. (1991) en ovino y Lehloenya y Greyling (2010) en caprino, sin embargo hay que tener en cuenta que en esos trabajos se utilizan hembras prepúberes, por lo que es muy posible que el número de folículos sensibles a la LH presentes en los ovarios de esas hembras sea menor que en las hembras adultas. En nuestro caso, las conejas nulíparas utilizadas son reproductivamente maduras, por lo que sus ovarios son capaces de responder al tratamiento de estimulación ovárica.

Tabla 1. Efecto del tipo de hembra sobre las variables de recuperación (media cuadrática ± error estándar).

Grupo	N	Inducción ovulación	Tasa ovulación	Embriones recuperados	Embriones normales	Embriones anormales
Múltiparas	25	0,96±0,064	39,3±2,99 ^a	23,0±2,93 ^a	20,7±3,35 ^a	3,4±1,10
Nulíparas	25	0,80±0,064	48,6±3,27 ^b	39,7±3,21 ^b	33,95±3,60 ^b	5,8±1,15

^{a,b} Valores en la misma columna con diferente letra difieren estadísticamente (P<0,05).

En la Tabla 2 se muestran los resultados del desarrollo *in vitro* de los embriones tras el cultivo. En el caso de los embriones frescos, la tasa de blastocistos expandidos fue similar en ambos grupos de hembras (nulíparas o múltiparas), mientras que la tasa de blastocistos escapados fue significativamente superior en los embriones procedentes de hembras nulíparas. No

obstante, cuando los embriones eran sometidos a un proceso de crioconservación, la tasa de blastocistos expandidos era significativamente más baja para los embriones que procedían de hembras múltiparas, mientras que no se observaron diferencias significativas en la tasa de blastocistos escapados.

Tabla 2. Efecto del tipo de hembra sobre el desarrollo in vitro (media cuadrática \pm error estándar).

	Embriones Frescos			Embriones desvitrificados		
	Nº	Tasa de blastocistos expandidos	Tasa de blastocistos escapados	Nº	Tasa de blastocistos expandidos	Tasa de blastocistos escapados
Múltiparas	104	0,89 \pm 0,027	0,11 \pm 0,039 ^a	74	0,73 \pm 0,045 ^a	0,18 \pm 0,047
Nulíparas	99	0,94 \pm 0,028	0,33 \pm 0,040 ^b	76	0,90 \pm 0,044 ^b	0,24 \pm 0,047

^{a,b} Valores en la misma columna con diferente letra difieren estadísticamente ($P < 0,05$).

Estos resultados indican que, en conejo, las hembras nulíparas responden mejor que las múltiparas al tratamiento con corifolitropina alfa, obteniéndose un mayor número de embriones por hembra y con un mejor potencial de desarrollo tras un proceso de crioconservación. No obstante, las hembras múltiparas al final de su proceso de selección pueden ser utilizadas para completar el banco de embriones, pero teniendo en cuenta que su potencial de desarrollo es inferior.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Duijkers I.J. et al., 2002. Hum Reprod;17(8):1987-93.
- Devroey P. et al., 2004. J Clin Endocrinol Metab. 89:2062-70.
- Driancourt, M.A. & Avdi, M., 1993. Anim. Reprod. Sci. 32, 227-236.
- Lehloenya K.C. & Greyling J.P.C., 2010. S Afr J Anim Sci. 40 (1):65-69.
- Lima W.M. et al., 2007. Anim Reprod Sci. 100(3-4):364-370.
- Rangel-Santos R. et al., 1991. Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod. 51:139-142.
- Takeo T. & Nakagata N., 2015. PLoS One 10, e0128330.
- Vicente J.S. et al., 1999 Reprod Nutr Dev. ;39(5-6):657-62.
- Vicente J.S. et al., 2018. Anim Reprod Sci. 192:321-327.
- Viudes de Castro M.P. et al., 2017 Theriogenology. 98:68-74.

Agradecimientos: Financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad: AGL2017-85162-C2-1-R y AGL2016-81890-REDT.

RESPONSE OF NULLIPAROUS AND MULTIPAROUS DOE RABBITS TO OVARIAN STIMULATION WITH CORIFOLLITROPIN ALPHA AND ITS EFFECT ON EMBRYO DEVELOPMENT AFTER CRYOPRESERVATION

ABSTRACT: Superovulation in animals is used to produce a maximum number of transferable embryos per donor. Embryo cryopreservation enables the establishment of genome cryobanking and saving embryos for an unlimited time. The introduction of corifollitropin alpha, a long-acting recombinant FSH, allows simplify superstimulation protocols. On the other hand, results of superovulation treatments vary, and donor is an important factor than affect superovulatory response. The aim of our study was to evaluate the effect of female category (nulliparous or multiparous) on ovarian stimulation with corifollitropin alpha and its effect on embryo development after cryopreservation. Our outcomes showed that the ovulation rate and normal embryos were significantly higher for nulliparous does. Expanded blastocyst rate from fresh embryos was similar in nulliparous and multiparous groups. However, in vitro development of devitrified embryos was significantly affected by female category. Expanded blastocyst rate from vitrified embryos was higher in nulliparous females.

Keywords: superovulation, corifollitropin alpha, vitrification, rabbit.