

## **ESTIMULACIÓN CON rFSH-CTP Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES PARA LA REFUNDACIÓN DE UNA LÍNEA DE CONEJO SELECCIONADA POR VELOCIDAD DE CRECIMIENTO**

Juarez, J.D.<sup>1</sup>, Talaván, A. M.<sup>1</sup>, García-Domínguez, X.<sup>1</sup>, García-Valero, L.<sup>1</sup>, Viudes de Castro, M.P.<sup>2</sup>, Marco-Jiménez, F.<sup>1</sup>, Vicente, J.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Tecnología Animal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Segorbe (Castellón).  
jvicent@dca.upv.es

### **INTRODUCCIÓN**

La obtención, crioconservación y transferencia de embriones son herramientas fundamentales en la difusión, conservación y en la rederivación de recursos genéticos animales. Sin embargo, es frecuente que protocolos, optimizados para una línea, estirpe o raza, den lugar a resultados inesperados cuando se utilizan sobre otras. En el conejo puede observarse que tanto la respuesta a la superovulación, a la crioconservación y la viabilidad post-transferencia de los embriones dependen de la línea genética (Kauffman et al., 1998; Vicente et al., 2003; Mehaisen et al., 2005; Salvetti et al, 2007; Vicente et al., 2013; Naturil-Alfonso et al., 2016). La línea sintética R proviene de la fusión de dos líneas paternas, una fundada en 1976 con conejos de origen California criados por agricultores valencianos y otra fundada en 1981 con conejos pertenecientes a líneas paternas especializadas (Estany et al., 1992). La línea R es seleccionada por ganancia media diaria durante el engorde desde hace 30 años. En la actualidad tras más de 40 generaciones en las instalaciones de la Universitat Politècnica de València evidencia una baja eficiencia reproductiva, baja fertilidad y prolificidad al parto, a pesar de tener tasas de ovulación y tasas de fecundación similares a líneas seleccionadas por tamaño de camada. En estudios previos se ha comprobado que las conejas de esta línea muestran fallos de inducción de la ovulación, patrones esteroidogénicos anormales durante la gestación, niveles de IGF-I elevados, deficiencias en receptores para IGF-II e incluso un patrón de movilización metabólica de los recursos diferente al de las líneas maternas, todo ello podría ser la causa de su baja eficiencia reproductiva (Llobat et al., 2012; Vicente et al. 2012; Arnau-Bonachera et al., 2018). Como consecuencia de esta baja eficiencia reproductiva, la presión de selección sobre esta línea ha tenido que reducirse. No obstante, varios núcleos de selección asociados disponen de poblaciones de esta línea en la que es posible recuperar tanto orígenes genéticos como parte de la presión de selección perdida. Una vía para re-integrar estos animales es la obtención de embriones de los genotipos de interés y transferirlos sobre una de las líneas maternas de nuestro núcleo, con el fin de expandir la población de la línea R para su selección y estudio. En los últimos años, se ha aplicado con éxito un tratamiento de superovulación basado en la utilización de una FSH recombinante de larga duración denominada Coriofolitropina alfa (rFSH-CTP). Este tratamiento presenta ventajas sobre el tratamiento de superovulación con eCG o FSH hipofisarias, ésta última todavía se usa comúnmente en el conejo ya que muestra una respuesta superior a la eCG y una calidad embrionaria similar a los tratamientos secuenciales con FSH hipofisaria porcina o recombinante humana (Tsiligianni, et al., 2004; Mehaisen et al., 2005 y 2006; Salvetti et al, 2007 y 2011; Viudes et al., 2015,2017 y 2019). Sin embargo, la respuesta o la viabilidad de los embriones obtenidos debe ser evaluada en cada línea, estirpe o raza, ya que los problemas derivados de la aplicación de los tratamientos de superovulación subsisten a nivel de predicción de la respuesta, fecundidad de los óvulos anormales y en ocasiones sobre el desarrollo embrionario e incluso sobre su tolerancia a los métodos de crioconservación (Kauffman et al, 1998; Mehaisen et al., 2006, Salvetti et al, 2011). El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilización del tratamiento de rFSH-CTP en la línea R con la finalidad de incrementar el número de orígenes en el núcleo de selección UPV a partir de la descendencia de los genotipos seleccionados en centros asociados.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

El estudio se ha realizado de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE CEE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (centro usuario ES462500001091 y protocolo registrado con el número 2018/VSC/PEA/0116). Un total de 44 conejas adultas de la línea R

fueron inseminadas con machos fértiles de 20 orígenes diferentes cuya ganancia media diaria durante el periodo de engorde se situó en torno a 60g/día ( $61,2 \pm 0,45\text{g/día}$ ). Diecinueve de las hembras fueron sometidas a un tratamiento de superovulación con la hormona corifolitropina alfa (rFSH-CTP; Elonva®, 150 µg/mL, Merck Sharp & Dohme, S.A.; Spain) en una única dosis de 3µg/hembra por vía subcutánea. Las otras veinticinco hembras se utilizaron como control, y tan sólo se estimuló su receptividad con 20UI de eCG. Las conejas fueron montadas con machos asignados, evitando que los donantes tuvieran abuelos comunes. Tras la monta, las conejas recibieron una inyección intramuscular de 1 µg de acetato de buserelina (Suprefact; Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, Spain) para reforzar el estímulo de la ovulación. Las conejas fueron sacrificadas 72-74 horas después de la inseminación mediante la administración intravenosa de 1 mL/kg de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol especialidades veterinarias, S.A., Vétoquinol, Madrid, Spain). Después, se les extirpó el aparato reproductor para llevar a cabo la recuperación de embriones mediante la perfusión de cada uno de los oviductos con 10 mL de tampón fosfato salino (Dulbecco's phosphate buffer serum, DPBS, Sigma, St. Louis, MO, USA) que fue suplementado con 0,2% (v/w) de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,132 g/L de CaCl<sub>2</sub>, y antibióticos (penicilina G sódica 300.000 UI, penicilina G procaína 700.000 UI y sulfato de dihidrostreptomina 1250 mg/L, Penivet 1, Divasa Farmavic, Barcelona, España), y atemperado a 37°C. Tras realizar el lavado con el medio de perfusión, los embriones se clasificaron atendiendo a sus características morfológicas, considerando embriones normales a aquellos en el estadio de mórula o blastocisto temprano con una masa homogénea de células, sin irregularidades y con la zona pelúcida y la capa de mucina intacta. Los embriones fueron introducidos en una pajuela de 0,125 ml (L'Áigle, France), identificados y conservados a 16°C hasta su utilización. La transferencia se realizó en el núcleo de la UPV 4-6 horas después de la obtención de los embriones. Las hembras receptoras, conejas multiparas de la línea maternal A (origen Neozelándes y seleccionadas por índice familiar durante 48 generaciones) fueron inducidas a ovular 72 horas antes de la transferencia con 1 µg de acetato de buserelina (Hoechst, Marion Roussel, Madrid, Spain) vía intramuscular. Se anestesió a las receptoras con 16mg/kg de hidrocloruro de xilacina (Xilagesic, Calier), 35mg/kg de hidrocloruro de ketamidor (Ketamidol, Richter Pharma) y 0.01mg/kg de buprenorfina (Bupaq 0.3%, Richter Pharma). Se transfirieron un total de 463 embriones a los oviductos de 46 receptoras mediante laparoscopia. El número de embriones recuperados normales por coneja fue analizado mediante un análisis de la varianza, utilizando como factor fijo el tratamiento de estimulación (control-20UI de eCG y rFSH-CTP). Los porcentajes de donantes de embriones normales respecto del total de conejas, orígenes macho con descendencia respecto del total y, los nacidos totales y nacidos vivos en relación con el número de embriones transferidos entre tratamientos de estimulación se analizaron con una Chi-cuadrado con corrección de Yate's. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS (SPSS 21.0 software package; SPSS Inc., 2002, Chicago, IL, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento de estimulación ovárica con 3µg de rFSH-CTP tuvo una respuesta superovulatoria en todas las hembras, aunque sólo del 78,9% de ellas se obtuvieron embriones clasificados como normales y por tanto transferibles. Este porcentaje fue similar al obtenido en las conejas no estimuladas con rFSH-CTP aunque el número de embriones por coneja fue inferior (8,7 embriones frente a 19,1 por coneja, tabla 1). No obstante, la viabilidad de los embriones procedentes de las hembras tratadas con rFSH-CTP fue significativamente inferior a la obtenida con los embriones procedentes de hembras control (tabla 1). Estos resultados contrastan con los obtenidos anteriormente en una línea maternal (seleccionada por tamaño de camada), ya que la utilización de la rFSH-CTP con o sin suplementar con LH o hCG determinó una tasa de ovulación entre 42 y 52,9 y entre 28 y 41 embriones transferibles por coneja (Viudes et al., 2017 y 2019), resultados muy superiores a los obtenidos en el presente trabajo. No obstante, la viabilidad al nacimiento pos-transferencia de los embriones obtenidos con rFSH-CTP, si bien no fueron significativamente diferentes al control, registraron valores inferiores al mismo (53% frente al 75%; Viudes de Castro et al., 2017) al igual que sucede en el presente trabajo. Es probable que el tratamiento de estimulación realizado sea insuficiente para esta línea de crecimiento, ya que son animales con un mayor peso corporal, con baja actividad sexual, dificultades para ser inducidas a ovular por monta y que presentan

un patrón diferente de movilización metabólica de los recursos (Vicente et al. 2012; Arnau-Bonachera et al., 2017), por lo que será necesario ajustar la cantidad de gonadotropina recombinante utilizada y considerar el periodo de actuación de la misma en este tipo de animales. En relación con el objetivo para re-incorporar orígenes de esta línea al núcleo de selección, cabe reseñar que a pesar de los bajos resultados de viabilidad obtenidos en las hembras R estimuladas con rFSH-CTP, se han obtenido un total de 189 conejos de 19 orígenes macho, número de familias de machos superior al que sería necesario para la conservación de genoma de esta línea, asegurar su reproducción y continuar con el programa de selección.

**Tabla 1.** Embriones recuperados, viabilidad al parto y orígenes macho re-introducidos en el núcleo de selección

Grupo	Conejas	Origen macho	ER mediatas	Donantes (%)	ET	NT (%)	NV (%)	Origen macho* (%)
Control	25	14	8,7 2,32 <sup>a</sup>	20 (80,0)	192	120 (62,5) <sup>a</sup>	100 (52,1) <sup>a</sup>	11 (78,5)
CTP-FSH	19	12	19,1 2,67 <sup>b</sup>	15 (78,9)	341	105 (30,8) <sup>b</sup>	89 (26,1) <sup>b</sup>	8 (67,7)
Total	44	26	13,2 1,77	35 (79,5)	533	225 (41,4)	189 (34,8)	19 (73,1)

ER: embriones recuperados; ET: embriones totales; NT: nacidos totales; NV: nacidos vivos; <sup>a,b</sup> Valores en la misma columna con diferente letra difieren estadísticamente (P<0.05).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Arnau-Bonachera, A. et al 2018. *Animal* 12(9):1867-1876. •Estany, J. et al., 1992. *Gen. Sel. Evol.* 24: 527–537. •Kauffman, R.D. et al., 1998. *Theriogenology* 50:1081-1092. •Llobat et al., 2012. *Reprod. Domes. Anim.* 47: 281–287. 2012. •Mehaisen, G.M.K. et al., 2005. *Anim Reprod Sci* 90(1-2): 175–184. •Naturil-Alfonso et al., *Animal* 2016. 24:47-53. •Mehaisen, G.M.K. et al., 2006. *Theriogenology* 65(7): 1279–1291. •Salvetti, P. et al., 2007. *Theriogenology* 67: 1185–1193. •Tsiligianni, T. et al., 2004 *Theriogenology*, 61(6): 989–995. • Vicente, J.S. et al., 2003. *Reprod. Nutr. Dev.* 43: 137–143. •Vicente J.S. et al., 2012. *Theriogenology* 77: 81–8. •Vicente, J.S. et al., 2013. *Cryobiology* 67(3): 321–326. •Viudes-de-Castro, M.P. et al., 2015 *Theriogenology* 84(3):446–451. •Viudes de Castro, M.P. et al., 2017. *Theriogenology* 98:68-74.

(1 línea en blanco)

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

#### STIMULATION WITH rFSH-CTP AND EMBRYO TRANSFER TO RE-ESTABLISHMENT OF RABBIT GROWTH LINE

**ABSTRACT:** The use of coriofolitropin alfa (rFSH-CTP) in a paternal line (R line) selected for growth rate (daily mean gain) to increase the quantity of family origin through a superovulatory treatment was done. Forty four does belonging to the synthetic line R, were inseminated with bucks from 20 different family origin, 19 does were superovulated with CTP (3 µg/female) and 25 does used as control treatment were increase the receptivity with 20UI of eCG. Embryos were recovered 72-74 hours after insemination, scored by morphological characteristics and normal embryos stored in a 0,125 mL straw at 16°C 4-6 hours after embryo recovery. A total of 463 embryos were transferred into oviducts of 46 synchronized recipient does belonging to maternal line. Seventy nine percent of does respond to superovulatory treatment but the embryo viability at birth was less than control group (30.8 vs 62.5%, respectively). Despite the low viability results, a total of 189 rabbits from 19 male family origins were obtained, rabbit enough to assure the re-establishment of line and will allow progress in selection program.

**Keywords:** Coriofolitropin alfa, growth rabbit, embryo viability.