EFECTO DE LA METODOLOGÍA DE RECUPERACIÓN DE EMBRIONES DE CONEJO SOBRE LA VIABILIDAD IN VITRO POST DESVITRTIFICACIÓN.

Lavara R, Mehaisen G.M.K., Vicente J.S.
Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia. Cno de Vera 14. C.P. 46071-Valencia. España.
Rlavara@dca.upv.es

INTRODUCCIÓN

Existen líneas seleccionadas en conejo que es necesario preservar. En esta especie, la congelación y vitrificación de embriones han demostrado ser técnicas efectivas para la reconstitución de poblaciones (Joly *et al.*, 1996, García *et al.*, 2000)

En los últimos años se han empleado embriones crioconservados pertenecientes a líneas seleccionadas como poblaciones control para poder evaluar la respuesta a la selección (Santacreu *et al.*, 2000; García y Baselga 2002). Por otro lado se ha demostrado la posibilidad de difusión de material genético a otros países sin riesgos de transmisión de enfermedades (García *et al.*,2000b) y la preservación de recursos genéticos animales (Bolet *et al.*, 2000).

En estudios anteriores se demostró que líneas seleccionadas por velocidad de crecimiento tenían una tasa de recuperación de embriones normales inferior a las líneas seleccionadas por caracteres reproductivos (Viudes de Castro *et al.*,1995, Lavara *et al.*, 2001, Vicente *et al.*, 2003), además de la diferencia existente en la relación número de nacidos por embrión transferido post-desvitrificación entre líneas maternales y de crecimiento (34-36% *vs* 25%, Vicente *et al.*, 2003) por lo que en este tipo de líneas sería conveniente utilizar técnicas de recuperación *in vivo* (Besenfelder *et al.*, 1998, Kidder *et al.*, 1999, Forcada y López 2000) que permitiesen aumentar el número de embriones obtenidos por hembra lo que facilitaría su reconstitución.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la viabilidad tras la vitrificación de los embriones de conejo recuperados *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS:

-Sincronización de las hembras donantes e inseminación artificial.

Como donantes se utilizaron hembras pertenecientes a la línea R, seleccionada por velocidad de crecimiento desde el destete (28 días) hasta el sacrificio (63 días) (Estany *et al.*, 1992).

Para sincronizar la receptividad de las hembras, se les administró subcutáneamente una dosis de 50 UI de PMSG (Gonaser, Hipra) 60 horas antes de la inseminación. Las hembras fueron inseminadas con semen procedente de machos adultos de la misma línea y generación con los que no estuviesen emparentados. El método de recuperación, valoración y dilución del semen y posterior inseminación utilizado fue el descrito por Lavara *et al.* (2000).

-Recuperación de embriones.

GRUPO POSTMORTEM (control): Las hembras fueron sacrificadas 72-76 horas después de la inseminación, perfundiéndose oviductos y cuernos uterinos con 20 ml de medio de recuperación de embriones (Mre): DPBSCa [0.132 g cloruro cálcico por litro de DPBS (Sigma, D-5773)], suplementado con 3 g BSA (Sigma, A3311) más antibióticos (PENIVET 1, Lab. Divasa Farmavic) por litro.

GRUPO IN VIVO: Los embriones fueron recuperados mediante laparoscopía 76-78 horas tras la inseminación según el método descrito por Besenfelder *et al.*, (1998).

En ambos grupos los embriones recuperados fueron catalogados basándose en criterios morfológicos, considerándose embriones normales aquellos embriones

en estadio de mórula compactada o blastocisto temprano que presentaban una masa de células homogénea y ninguna anomalía en la cubierta de mucina y zona pelúcida.

Vitrificación.

El medio de vitrificación empleado fue el descrito por Vicente *et al.*, (1999), con la siguiente composición: 1:1:2 (v/v/v) de dimetilsulfóxido (3.5 M DMSO, Sigma D5879), etilenglicol (4.4M EG, Sigma 9129) en medio recuperación (Mre). Los embriones recuperados de cada hembra donante fueron vitrificados según el procedimiento descrito por Vicente *et al.*, (1999).

Desvitrificacón y posterior cultivo

La desvitrificación se realizó por inmersión de la pajuela en un baño de agua a 20ºC agitándola suavemente, durante 10-15 segundos. El medio de vitrificación se eliminó mediante una dilución en dos pasos. Los embriones con el medio de vitrificación se depositaron en una placa petri de 35 mm de diámetro que contenía una solución de 0.33M Sacarosa en DPBS. Después de 2 minutos, los embriones fueron lavados de nuevo en DPBSCa y valorados morfológicamente antes de su posterior introducción en placas de cultivo, utilizándose únicamente los embriones no dañados. Los embriones fueron introducidos en placas Nunc con el medio de cultivo elegido (M-199 con 50 mM HEPES, suplementado con 20% FCS (Fetal Bovine Serum)) y se introdujeron en el incubador bajo unas condiciones de 38,5ºC, 5% CO_2 y humedad a saturación. El tiempo de cultivo fue de 48 horas, transcurridas las cuales se procedió a la valoración de los embriones, considerándose como desarrollados los embriones que habían alcanzado los estados de blastocisto expandido y escapado.

Análisis estadístico

Tras la desvitrificación se tomaron los datos: número de embriones desvitrificados (EV), número de embriones intactos (EI), número de embriones cultivados (EC) y el número de embriones desarrollados tras el cultivo (ED). Se utilizó un Chi-cuadrado para analizar el efecto del tipo de recuperación de embriones (*in vivo* o *post-mortem*) sobre el porcentaje de embriones intactos post-desvitrificación (EI/EV), porcentaje de desarrollo *in vitro* (ED/EC) y porcentaje de desarrollados sobre vitrificados (ED/EV).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se desvitrificaron un total de 224 embriones, de los cuales 110 se recuperaron *post-mortem* y 114 por el procedimiento *in vivo*. Los resultados post-desvitrificación se muestran en la tabla de resultados (Tabla 1).

TABLA 1: Resultados desvitrificación y posterior cultivo de embriones vitrificados.

TIPO	EV	EI (%)	ED (%)	ED/EV (%)
IV	114	109(95%)	77 (71%)	(77/114) (68%)
PM	110	103 (94%)	75 (70%)	(75/110) (64%)
TOTAL	224	212 (95%)	152 (70%)	(152/224) (66%)

EV: Número de embriones desvitrificados; EI (%): número de embriones intactos (porcentaje de embriones intactos post-desvitrificación); ED (%): número de embriones desarrollados (porcentaje desarrollo in vitro); ED/EV (%):porcentaje de embriones desarrollados sobre desvitrificados

Para evaluar la viabilidad de los embriones crioconservados, se desvitrificaron un total de 224 embriones pertenecientes a los distintos grupos de estudio.(114 *in vivo*, 110 *post-mortem*), no encontrándose diferencias significativas en el porcentaje de embriones intactos post-desvitrificación (95% y 93% para la recuperación *in vivo* y *post-mortem* respectivamente), en el porcentaje de desarrollo *in vitro* (71% y 69% para el grupo *in vivo* y el control); ni en el porcentaje de desarrollados sobre desvitrificados (68% y 63% para el grupo *in vivo* y control respectivamente). Vicente

et al., (1999) y García *et al.*, (2000c), con embriones recuperados *post-mortem* pertenecientes a la misma línea de crecimiento obtuvieron resultados similares en el porcentaje de embriones intactos tras la vitrificación (93%, 85% respectivamente), mientras que Medjoub (2000) obtuvo un 61,6% en la raza Gigante de España con embriones recuperados *in vivo*. El desarrollo *in vitro* alcanzado en el presente trabajo es comparable a los obtenidos por otros autores (65% y 77% observado por Vicente *et al.*, 1994 y López-Bejar y López-Gatius 2000; respectivamente).

El porcentaje de embriones desarrollados *in vitro* sobre vitrificados obtenido mediante la recuperación *in vivo* es similar al registrado por los embriones recuperados *post-mortem* (Tabla 1), y comparable al de otras experiencias (49% de embriones desarrollados sobre vitrificados para la línea R, Lavara *et al.*, 2001). García *et al.*, (2000b) y Vicente *et al.*,(2003), tras la transferencia de embriones crioconservados de la línea R, mostraron un rendimiento global desde la vitrificación hasta el parto del 10% y 42%, respectivamente.

El presente estudio muestra que no existen diferencias *in vitro* en viabilidad embrionaria post-desvitrificación para embriones recuperados *post-mortem* o *in vivo*, lo que permitirá implementar la técnica de recuperación *in vivo* de embriones para aumentar sustancialmente el número de embriones recuperados por hembra donante y facilitar así la reconstitución de líneas o razas similares a la línea R.

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., BRUN J.M.....ZIMMERMANN J.M. 2000. *7th World Rabbit Congress. Vol. A: 231-316.*

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. *Liv. Prod. Sci (74) 45-53.*

GARCIA M.L; BASELGA M; VIUDES-DE-CASTRO M.P; VICENTE J.S. 2000. *Arch. Zootec. 49: 81-86.*

GARCIA M.L; BLUMETTO O; CARPA G; VICENTE J.S; BASELGA M. 2000b. *7th World Rabbit Congres. Vol (A) 139-142.*

GARCIA M.L; VIUDES-DE-CASTRO M.P; VICENTE J.S; BASELGA M. 2000c. *7th World Rabbit Congres. Vol (A) 143-146.*

JOLY T., VICENTE J.S., THEAU-CLEMENT M., GARCÍA-XIMENEZ F., BESENFELDER U., RENARD J.P., 1996. *Proceedings of 6th World Rabbit Congress,Vol (2) 293-298.*

KIDDER J.D., ROBERTS P.J., SIMKIN M.E., FOOTE R.H., RICHMOND M.E. 1999. *J. Reprod. Fertil. 116, 235-242.*

LAVARA R., LAVARA F., VICENTE J.S., MOCÉ E. 2000. *7th World Rabbit Congres. Vol (A) 173-178.*

LAVARA R., MOCÉ L., MOCÉ E., GARCÍA ML., VICENTE J.S. 2001. *III Congrs Ibérico Reproducción Animal. 409-414.*

LOPEZ BEJAR M., LOPEZ GATIUS F.2000. *Theriogenology 53, 529 (Abs)*

MEDJDOUB N. 2000. TESIS, CIHEAM Zaragoza.

SANTACREU, M. A.; ARGENTE, M. J.; MOCE, M. L.; BLASCO, A. 2000. *7th World Rabbit Congress. Vol. A: 491-496.*

VICENTE J.S., GARCÍA-XIMENEZ F. 1994. *Theriogenology 42, 1205-1215.*

VICENTE J.S.; GARCÍA M.L., VIUDES-DE-CASTRO, M.P., BASELGA M. 2003. Reprod. Nutr. Dev., In Press. Accepted 17/12/02.

VICENTE J.S.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; GARCIA, M.L. 1999. *Reprod. Nutr. Dev., 39: 657-662.*

VIUDES-DE-CASTRO M.P; GARCIA-XIMENEZ F; VICENTE J.S. 1995. *Invest. Agr.: Sanidad. Anim. Vol. 10 (2).*