EFICIENCIA DE LA RECUPERACIÓN *IN VIVO* DE ÓVULOS DE CONEJA POR LAPAROSCOPIA

Cortell, C.[1], Vicente, J.S.[2], Mocé, E.[1], Marco-Jiménez, F.[2], Viudes De Castro, M.P.[1]
[1]Centro Tecnología Animal (CITA). IVIA. Polígono de la Esperanza, 100,12400. Segorbe. (Castellón).
[2]Departamento de Ciencia Animal. U.P.V. Camino de Vera, s.n. 46071. Valencia.

INTRODUCCIÓN

La obtención de óvulos es una etapa imprescindible tanto para los programas de conservación *ex situ* de recursos genéticos (Holt y Pickard *et al*., 1999; FAO), como para su aplicación en diferentes técnicas reproductivas como ICSI, FIV o transferencia nuclear. En conejo, es habitual que las recuperaciones de ovocitos tengan lugar *post-mortem*. Para la obtención de ovocitos inmaduros se suelen utilizar las técnicas de cortes foliculares o "slicing" (Lorenzo *et al*., 1997) o de punción y aspiración de los mismos (Viudes de Castro *et al*., 1999; Mocé *et al*. 2002). En cambio, si se desea recuperar óvulos maduros, la técnica utilizada con más frecuencia es la recuperación *post-mortem* mediante lavado oviductal realizado a las 14 horas tras la inducción de la ovulación (Viudes de Castro *et al*. 2005; Zhao *et al*., 2006). La recuperación *in vivo* llevada a cabo por laparotomía (Liu *et al*. 2004) es bastante inusual.

La obtención de embriones se ha llevado a cabo en numerosas ocasiones *in vivo* por laparotomías (Forcada y López, 2000) y laparoscopias repetidas (Besenfelder *et al*., 1998; Lavara *et al*., 2005; Mehaisen *et al*., 2006) para optimizar el número de embriones recuperados por hembra. Debido a la ventaja que supone recuperar *in vivo*, especialmente cuando se utilizan poblaciones con escaso número de individuos o animales de gran valor, en este trabajo planteamos la recuperación de óvulos maduros por laparoscopia repetida en una misma hembra, haciendo uso de una técnica similar a la utilizada en la recuperación *in vivo* de embriones por laparoscopia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron hembras nulíparas de cuatro meses y medio de edad, pertenecientes a la línea A, seleccionada por tamaño de camada al destete (Estany *et al*., 1989). Éstas fueron sometidas a cuatro tratamientos de superovulación con rFSH (Gonal-F® 75, Serono, Italy), cada 30 días aproximadamente. Cada tratamiento consistía en tres inyecciones intramusculares de FSH disueltas en PVP, una cada 24 horas. Paralelamente se utilizó un grupo control al que se le inyectaba la misma solución sin hormona. El cuarto día a todas las hembras se les indujo la ovulación mediante la inyección intramuscular de 2μg de acetato de buserelina. Las laparoscopias fueron realizadas entre las 16 y las 18 horas posteriores a la inducción de la ovulación.

El procedimiento de laparoscopia utilizado fue similar al que se utiliza para recuperar embriones (Besenfelder *et al*., 1998). Las conejas fueron anestesiadas con una combinación de xilacina y ketamina. Tras distender el abdomen se introdujeron dos trócares caudalmente al esternón, estos fueron los puntos correspondientes al fórceps atraumático y al endoscopio. Tras hacer el recuento de la tasa de ovulación, se practicaron dos punciones en la región inguinal por las que se accedió a los oviductos, introduciendo el catéter con el medio de perfusión a través del infundíbulo de éstos y perfundiendo cada uno de ellos con 5 mL de medio DPBS con antibiótico. Posteriormente se perfundió cada uno de los cuernos uterinos con 50 ml de medio de lavado, que se recogió del fondo de vagina con un catéter de Foley conectado a una

bomba de aspiración. A continuación, se procedió a la localización y recuento de los óvulos.

Cada hembra fue sometida a cuatro procesos de recuperación con al menos un mes de intervalo entre cada uno de ellos. En cada sesión se registraron los datos de tasa de ovulación (TO) y número de óvulos recuperados (OR), calculando la eficiencia de la recuperación de óvulos en función de la tasa de ovulación (OR/TO expresado en porcentaje). Se analizaron los efectos del tratamiento de superovulación y del número de sesiones de recuperación (de 1 a 4), así como su interacción sobre la tasa de ovulación y la eficiencia de recuperación. El análisis de la eficiencia de recuperación se realizó tras una transformación angular de los datos (en la tabla 1 se muestran las medias sin transformar). Los análisis se llevaron a cabo mediante un GLM (General Linear Model) con el paquete estadístico Statgraphics®Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MO, USA). Las medias fueron comparadas con el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el análisis de datos, se observó que el tratamiento de superovulación afectó significativamente a la TO resultando menor en el caso de las hembras control (17,2±1,2 *vs*. 9,3±2,8; Tabla 1; $P<0,05$), como cabía esperar. Sin embargo, el tratamiento de superovulación no tuvo efecto significativo sobre la eficiencia de recuperación. No obstante, si se reanalizan los datos, atendiendo a la respuesta de las hembras al tratamiento de superovulación, y se considera que sólo han superovulado aquellas que tenían un tasa de superovulación igual a la media del grupo control más tres veces su error estándar (9,09±0,61) y se realiza un análisis de varianza de la eficacia de recuperación, una vez transformados angularmente los datos, se observan diferencias significativas a favor de las hembras que superovularon realmente tras el tratamiento (38 conejas, 71,3±5,27% frente al 48,3±5,74% de las 32 conejas no superovuladas; Tabla 1; $P<0,05$, datos sin transformar).

El primer hecho relevante es que sólo 38 de las 59 conejas han superovulado, lo cual corrobora los resultados obtenidos por Mehaisen *et al.* (2006), que observaron que la respuesta al tratamiento superovulatorio disminuye ya en el segundo tratamiento en conejas. El segundo hecho relevante es que las hembras realmente superovuladas podrían favorecen la perfusión *in vivo* de los óvulos al modificar el tránsito oviductal. Esto deberá ser demostrado en trabajos posteriores.

Tabla1. Resultados de tasa de ovulación y eficacia de recuperación de ovocitos

TRATAMIENTO	n	TO lsmeans±es	OR/TO lsmeans±es
Control	11	9,3±2,82^{b}	44,7±9,3
FSH	59	17,2±1,15^{a}	59,4±4,2
Nº recuperaciones			
1	11	14,1±2,75	33,0± 0,2^{b}
2	16	10,9±2,35	38,2±8,69^{ab}
3	15	15,1±4,21	69,5±15,6^{a}
4	28	12,8±2,49	60,7±9,23^{a}
Total	70	13,2±1,52	50,3±5,63

n: Número de hembras. TO: Tasa de ovulación. TO/OR: Eficiencia de recuperación. Las letras a y b en la misma columna implican diferencias significativas ($P<0,05$)

Respecto al efecto del número de sesiones de recuperación a los que se somete a una hembra sobre la eficiencia de la recuperación, sí se observaron diferencias significativas, siendo mayores las eficiencias de recuperación en la tercera y cuarta intervención que en la primera (69,5 y 60,7 % frente al 33%, respectivamente; Tabla 1; $P<0.05$). La interacción tratamiento-número de recuperaciones no resultó significativa. Estas diferencias podrían deberse por un lado a las modificaciones en el tránsito y/o captura de óvulos por parte del oviducto como consecuencia de que las conejas han completado ya dos ciclos sexuales, y por otro, a la adquisición de experiencia por parte del grupo de trabajo, ya que esta técnica entraña una dificultad añadida debido al momento de su aplicación. La perfusión 16-18 horas tras la ovulación implica generar una elevada presión intraluminal para vencer la falta de relajación de las paredes del itsmo, lo que en ocasiones puede generar pequeños reflujos. Además debemos considerar que los óvulos se encuentran demasiado cercanos a la entrada infundibular, de manera que, al introducir el catéter (al menos 1 cm para su sujeción) podría ser inevitable que, en alguna ocasión, el extremo de éste quede más profundo que algunos de los óvulos todavía rodeados por el cúmulo expandido y que, por tanto, éstos no sean perfundidos. La eficiencia del 50% obtenida por Besenfelder a las 14-15 horas tras la ovulación (comunicación personal) respaldarían estos resultados.

Finalmente, podríamos decir que, a pesar de las bajas eficiencias de las dos primeras sesiones (33,0 % y 38,2 % respectivamente, tabla 1), es posible alcanzar una eficiencia de recuperación de óvulos en MII superior al 60%. Así, esta técnica de recuperación *in vivo* de óvulos maduros de forma repetida sobre una hembra podría proporcionar una herramienta muy útil para estudios sobre la calidad ovocitaria, o para su utilización en otros campos de la biotecnología en el conejo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BESENFELDER U., STROUHAL C., BREM G. 1998. J. Vet. Med. 45, 577-579.

ESTANY J., BASELGA M., BLASCO A., CAMACHO. J 1989. Livest. Prod. Sci. 21, 67-75.

FAO. www.fao.org/docrep/004/y1100m/y1100m09.htm

FORCADA F., LÓPEZ M. 2000. Anim. Reprod. Sci. 64, 121-126.

HOLT WV., PICKARD AR. 1999. Reviews of reproduction. 4, 143-150.

LIU JL., KUSAKABE H., CHANG CC., SUZUKI H., SCHMIDT DW. JULIAN M., PFEFFER R., BORMANN CL., TIAN CL., YANAGIMACHI R., YANG X. 2004. Biol. Reprod. 70, 1776-1781.

LAVARA R., VIUDES DE CASTRO MP., MEHAISEN GMK., VICENTE JS., 2005. XI Jornadas Producción Animal.

LORENZO PL., ILLERA JC., SILVÁN G., MUNRO CJ., ILLERA MJ., ILLERA M. 1997. J. Reprod. Immunol. 35, 11-29.

MEHAISEN GMK., VIUDES DE CASTRO MP., VICENTE JS., LAVARA R. 2006. Theriogenology. 65, 1279-1291.

MOCÉ, E., VICENTE, J.S., LAVRA, R., 2002. World Rabbit Sci., 10: 53-62.

VIUDES DE CASTRO MP., MOCÉ E., VICENTE JS., LAVARA R. 1999. II Congreso Ibérico de Reproducción Animal. 228-230.

VIUDES DE CASTRO MP., MOCÉ E., VICENTE JS., MARCO JIMÉNEZ., LAVARA R. 2005. Reprod. Domest. Anim. 40, 136-140.

ZHAO ZJ., OUYANG YC., NAN CL., LEI ZL., SONG XF., SUN QY., CHEN DY. 2006. J. Reprod. Dev.52, 449-459.