

ESTUDIO DE LA SUPEROVULACION Y CONSERVACION DE EMBRIONES EN EL CONEJO DOMESTICO

De la Fuente J., Cocero M., Egea D., Barragan C.

INIA, Dpto. Reproducción Animal, Madrid

INTRODUCCION

Las técnicas de obtención, conservación y --
transferencia de embriones, constituyen uno de los --
mayores avances dentro del manejo reproductivo, en --
base a la mejora e incremento de la producción en --
las distintas especies zootécnicas.

El presente trabajo trata de ofrecer una me-
todología que dentro de su complejidad sea lo más --
sencilla posible, para su futura aplicación práctica.

El conejo puede así mismo considerarse un --
animal óptimo para la investigación, pues debido a --
su corto ciclo reproductivo y prolificidad se pueden
realizar estudios completos y exhaustivos en un tiempo
inferior al utilizado en otras especies. Puede --
considerarse la posibilidad de formación de un banco
de embriones, para el almacenamiento de material ge-
nético, tanto de aplicación científica para el mante-
nimiento de estirpes poco estables, como en su apli-
cación práctica sobre la producción.

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado veinticinco hembras, híbrido
comercial, doce de cuatro meses y el resto adultas -
secas, utilizando alojamientos metálicos a razón de

dos animales por jaula, con bebida y alimentación -- "ad libitum", a base de pienso comercial granulado. La experiencia se realizó en los meses de verano con temperatura y luz ambiente (17° C-34° C y 16 horas de luz aproximadamente).

Los animales donantes (n = 20) se agruparon en dos lotes en base a la utilización de las gonadotropinas : hormona folículo estimulante y gonadotropina del suero de yegüa gestante (FSH, PMSG) , como agentes superovuladores. El grupo de animales sometidos al tratamiento con PMSG, fué subdividido para la aplicación de dos diferentes regímenes de administración de hormona.

Grupo 1 ; PMSG

Grupo 1.1. Se administraron 150 u.i. de PMSG a cada animal en una sola dosis intramuscular. Setenta y dos horas después de la gonadotropina se inyectaron intravenosamente 150 u.i. de HCG. Realizándose acto seguido la cubrición.

Grupo 1.2. Se administraron 120 u.i. de PMSG a cada animal en cuatro inyecciones intramusculares, a un intervalo de doce horas entre cada una de ellas. Doce horas después de la última inyección de gonadotropina se administraron 30 u.i. de HCG por via intravenosa. Realizándose acto seguido la cubrición.

Grupo 2 ; FSH

Se administraron 1,50 mgr. de FSH a cada animal repartidos en 6 inyecciones intramusculares a un intervalo de 12 horas entre ellas. Doce horas después de la última inyección de gonadotropina se administraron 30 u.i. de HCG por via intravenosa, realizándose acto seguido la cubrición.

A fin de sincronizar el estado fisiológico - uterino entre los animales donantes y receptores se provocó una pseudogestación en estos, mediante la administración intravenosa de 30 u.i. de HCG en el mismo día y hora que a las donantes, en el caso de transferencia en fresco y con 3 - 4 días de antelación en el caso de los congelados.

La cubrición se realizó mediante I.A., según la técnica empleada de forma rutinaria en el Departamento, o por monta natural en los casos en los que la hembra fué receptiva.

La obtención de los embriones se realizó de forma quirúrgica en el tercer - cuarto día después - de la cubrición.

Técnica quirúrgica :

Se utilizó un tranquilizante, Combelen ---- 0'5 cc/Kg-p.v. administrado intramuscularmente, para proceder a la depilación y desinfección con alcoholiodado de la zona operatoria.

La inducción anestésica se realizó mediante Ketanina a dosis de 4 mg/Kg-p.v. El mantenimiento en los casos que se hizo necesario, se realizó a dosis de 2 mg/Kg-p.v. , administrado intravenosamente.

Se practicó una incisión de unos 7 cm. por - la línea alba, desde el último par de mamas en dirección torácica, y una vez sepados los bordes, se localizó el tracto genital mediante palpación, para exteriorizarlo y realizar la observación de los ovarios y confirmar la respuesta ovulatoria teniendo en cuenta el aspecto ovárico general y realizando el recuento de CL y otras posibles formaciones.

Mediante punción con trocar en la porción -- distal del útero y canulación de la porción proximal, se realizó la obtención de los embriones por arrastre con PBS + 2% FSC a 37° C. Individualizando los lavados uterinos para el recuento y evaluación morfológica de los embriones.

Se introdujo el tracto genital en la cavidad abdominal y se practicó una sutura con cargut de los planos musculares y con grapas o seda de la piel.

Todos los materiales utilizados fueron esterilizados y siliconizados con anterioridad. Las operaciones fueron realizadas por dos personas y en un tiempo aproximado de 30 minutos.

Una vez localizados y aislados del medio de lavado, los embriones fueron llevados a placas petri de 35 mm. que contenían PBS + 20% FCS, donde se procedió a su evaluación morfológica con el fin de desechar a los retrasados, degenerados y no fecundados.

Los embriones morfológicamente aceptables -- fueron distribuidos en dos grupos para ser utilizados con diferentes propósitos:

- cultivo in vitro
- congelación

El cultivo in vitro se realizó a 37° C en -- una atmósfera de 5% de CO₂, introduciendo a los embriones en microgotas de medio enriquecido con 20% de FCS, bajo aceite de parafina.

La congelación se realizó utilizando un biocongelador programable, en el cual se estabilizó la -- cámara de enfriamiento a 20° C antes de la introduc-

ción de los embriones, los cuales se habían incluido previamente en una solución de glicerol 1'5 M. y depositados en el interior de la cámara, para ir reduciendo su temperatura a razón de 1° C/min. hasta -7° C, momento en el que se indujo la cristalización de las muestras. La siguiente rampa de enfriamiento se programó a 0'4°/min. hasta alcanzar los -30° C, temperatura a la cual se introdujeron directamente en nitrógeno líquido (-196° C).

La descongelación se realizó de forma ultrarápida mediante la introducción de los embriones en un baño maria a 37° C.

La viabilidad embrionaria posterior a la descongelación se comprobó mediante cultivo in vitro, -tenciones vitales de fluorescencia y por transferencia.

Las transferencias a las receptoras se llevaron a cabo realizando los mismos preparativos y anestesia que para las donantes, practicándose la intervención quirúrgica por el flanco y depositando los embriones mediante micropipeta en la parte distal de cada útero a razón de 4-6 embriones por útero.

RESULTADOS Y DISCUSION

De los animales donantes, cuatro fueron excluidos de la experiencia, ya que uno de ellos no respondió al tratamiento, otro padecía una metritis en el momento de la obtención, el tercero fué agredido y el último fué una baja.

Técnicas quirúrgicas

Los resultados de recuperación de embriones-

fueron del 93%, cifra similar a la presentadas por -- otros autores, aunque se apreció una clara ventaja -- de las operaciones realizadas por el flanco frente a las abdominales ventrales, pués a pesar de resultar-- en principio mas sencilla esta última via de acceso, se originó un alto porcentaje de autodestruccio-- nes de las suturas, que junto con el exceso de peso-- localizado en la zona, contribuyó a la presentación -- de evisceraciones del paquete intestinal, que obliga-- ron a repetidas resecciones de bordes cicatriciales y nuevas suturas. Se apreció así mismo, un aumento -- en los casos de infección de la cicatriz, al estar -- en contacto directo con el suelo de la jaula.

A medida que se fué dominando la técnica qui-- rúrgica, se fué preveyendo la excesiva manipulación del tracto genital, pues en un principio se origina-- ron un gran número de adherencias.

Respuesta superovulatoria

Macroscópicamente se apreció una gran dife-- rencia entre los ovarios superovulados con FSH, con un tamaño similar al fisiológico, y con PMSG los cua-- les estaban aumentados en 5 e incluso 10 veces, apre-- ciándose así mismo la presencia de grandes quistes , que permanecieron por espacio de meses hasta ser tra-- tados hormonalmente.

Según el cuadro 1, en el que se representa -- el número de embriones totales y el promedio por coneja y por tratamiento, puede apreciarse una disminu-- ción manifiesta en la respuesta, en el grupo al que-- se inyectó en una sola ocasión la dosis de PMSG --- (PMSG-1), lo cual puede sugerir un exceso en la do-- sis, lo que originaría una disminución en la respues-- ta como demostró Mariana (1.980), trabajando sobre --

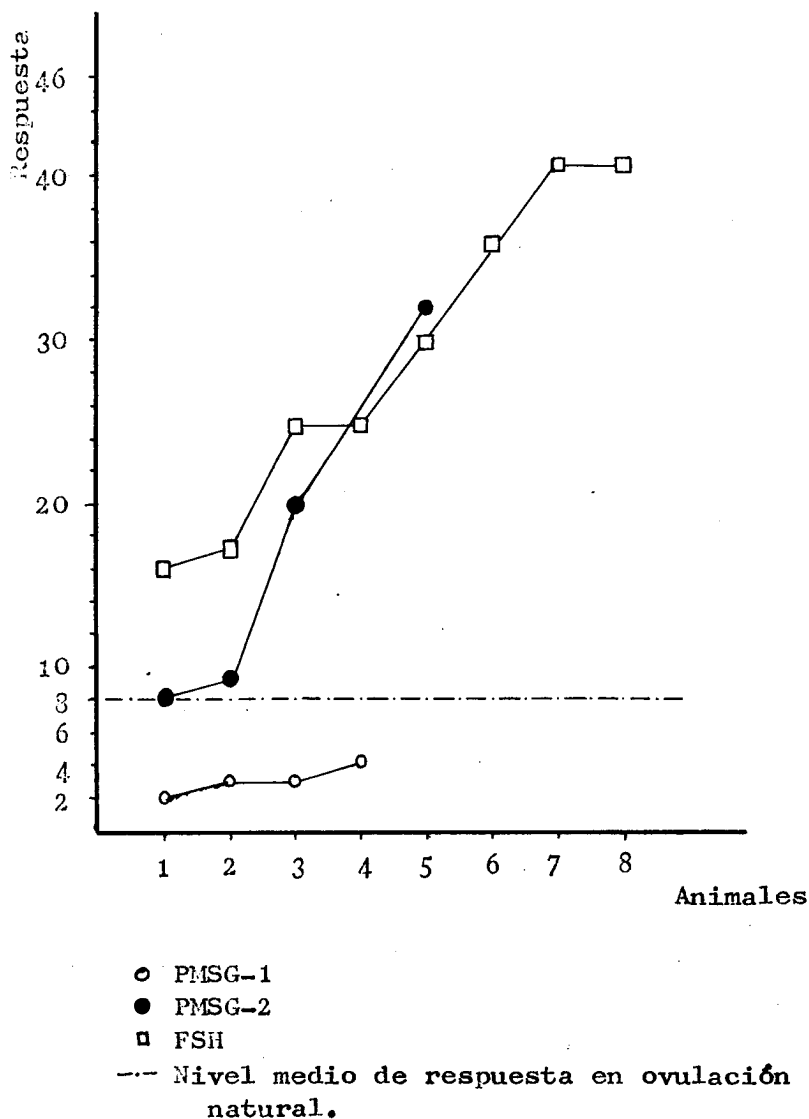
trés estirpes diferentes de ratas, cuya respuesta -- disminuye frente a incrementos progresivos de la dosis de hormona, al sobrepasarse la dosis óptima. En contradicción con estos datos se encuentran los trabajos de Roldán (1.979), que encontró una respuesta de 15 ± 3 embriones/coneja, similar a la obtenida -- con el tratamiento PMSG-2 , pero utilizando conejas Neozelandesas puras. Los valores medios por animal -- para los otros tratamientos (cuadro 1) están acordes con los encontrados por otros autores (Maurer 1.968, Hafez 1.970, Renard 1.982), apreciándose superiores -- en número los obtenidos mediante FSH frente a los de PMSG-2 ($28'8 \pm 9'7$ vs $17'2 \pm 11'2$).

Cuadro 1: Respuesta superovulatoria según el tratamiento utilizado: Número total de embriones y -- promedio por animal.

	<u>Nº anim.</u>	<u>Nº emb.</u>	<u>\bar{X} de emb./anim.</u>
PMSG-1	4	12	$3'0 \pm 0'7$
PMSG-2	8	69	$17'2 \pm 11'2$
FSH	8	231	$28'8 \pm 9'7$

Es necesario hacer resaltar la variabilidad -- en la respuesta superovulatoria frente a la PMSG y -- así en la figura 1, puede apreciarse que solo el 50% de los animales superovulan, mientras que el resto -- prácticamente solo cicló, ya que su respuesta se mantuvo en los límites de una ovulación natural : ---- $8'8 \pm 0'2$ embriones por animal (Parvex 1.982). Esta -- respuesta frente a la PMSG se ha puesto igualmente -- de manifiesto en trabajos realizados en este Departamento, sobre ganado vacuno, en los que se observó -- que animales que no respondieron fueron capaces de -- ciclar (De la Fuente y Col. 1.984).

Figura 1: Respuesta superovulatoria: Distribución individual de las respuestas.



De la misma forma, al comparar ambos agentes folículo estimulantes en cuanto a la calidad de los embriones (cuadro 2), se aprecia un incremento considerable del porcentaje de embriones retrasados y degenerados obtenidos a partir de la utilización de PMSG, frente a los encontrados con FSH (33% vs 13%). No se encontraron sin embargo, diferencias en el número de embriones no fertilizados, el cual permanece bajo, sin apreciarse influencia del tipo de cubrición, I.A. vs monta natural.

Cuadro 2: Calidad embrionaria según el tipo de tratamiento

	<u>Normales</u>	<u>Dg. y Rt.</u>	<u>No fert.</u>
PMSG-1	9/12 (75%)	2/12 (16%)	1/12 (8%)
PMSG-2	42/69 (60%)	23/69 (33%)	4/69 (5%)
FSH	182/231 (78.7%)	31/231 (13%)	18/231 (7%)

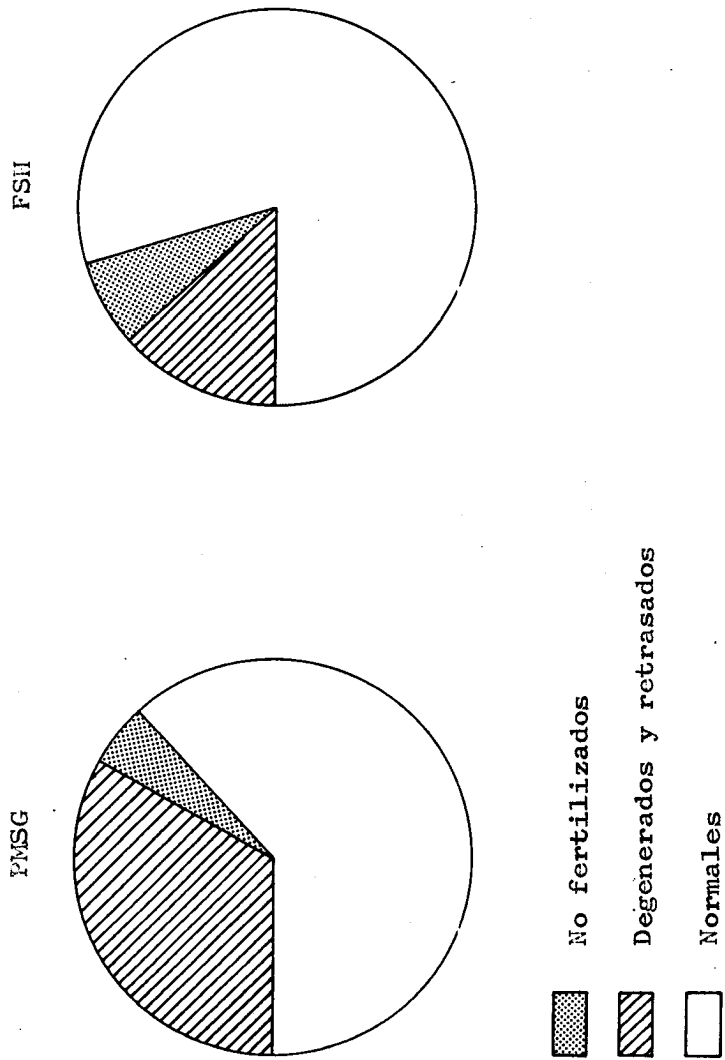
Dg. - Degenerados

Rt. - Retrasados

De los embriones considerados morfológicamente normales el 28% (65/233) corresponde a blastocitos con blastocelo y botón embrionario bien diferenciados y el resto (168/233), a morulas de aproximadamente 32 células y 0.15 mm. de diámetro de su zona pelúcida.

La relación en porcentajes de embriones normales, degenerados y no fertilizados se puede apreciar en la figura 2.

Figura 2: Calidad embrionaria según el tipo de tratamiento. (%).



Conservación embrionaria

Desarrollo in vitro:

Un total de 125 embriones, diagnosticados -- viables al momento de su obtención, fueron cultiva-- dos durante 24 horas, encontrándose que el 60'8 % de ellos se desarrolló de forma apreciable (cuadro 3) , pero cuando se mantuvo el cultivo hasta las 48 horas solo el 63% continuó su desarrollo, lo cual para el total de los inicialmente puestos en cultivo repre-- senta un 38'4% , porcentaje relativamente bajo en -- comparación con los obtenidos en otras experiencias. Aunque el método puede ser utilizado como diagnósti-- co de viabilidad, resulta insuficiente para una apli-- cación práctica en el caso de almacenaje de un exce-- so de embriones, resultando además muy compleja y -- costosa la infraestructura necesaria para su realiza-- ción, desde el punto de vista práctico.

Cuadro 3: Desarrollo embrionario in vitro.

Embriones desarrollados in vitro

<u>A las 24 horas</u>	<u>A las 48 horas</u>
76/125 (60'8%)	48/76 (63'19%)
	48/125 (38'4 %)

Congelación:

El proceso de congelación se ha realizado -- tratando de simplificar lo más posible la técnica, -- pero evitando una fuerte caída de los resultados. De esta forma y mediante la utilización de temperaturas medias de inmersión en nitrógeno líquido, se ha podi--

do - realizar la descongelación ultrarápida (Lehn -- Jensen, 1.932), siendo los resultados similares a -- los ofrecidos por otros autores (Maurer 1.976, Pav vex , 1.980), los cuales proponen la realización de curvas más largas.

Cuadro 4: Congelación: Desarrollo in vitro e in vivo de los embriones descongelados,

<u>Nº de emb.</u>	<u>Cultivo 24 h.</u>	<u>Implantación</u>
28	7/27 (26%)	0/1
56	----	2/4 (50%)
TOTAL.----		2/5 (40%)

Según se aprecia en el cuadro nº 4 un 26% de los embriones descongelados continua su desarrollo - después de 24 horas de cultivo, aunque ningún embrión se consigue implantar al ser transferido a una receptora. No sucede así con aquellos descongelados y -- transferidos sin previo cultivo, en los que se consigue un 50% de gestaciones.

CONCLUSIONES

- Se ha encontrado como mejor método de superovulación el tratamiento en base a FSH.
- La congelación de los embriones ha resultado ser un método factible y valioso, tanto bajo un enfoque - experimental como de aplicación práctica, imponiéndose la simplificación y mejora de los resultados obtenidos con las técnicas de conservación.

BIBLIOGRAFIA

De la Fuente J., Lopez A., Cocero M. y Barragán M.
II Congreso Nacional de Buiatria. 1.984. En -
prensa.

Hafez E.S.E. Reproduction and breeding techniques
for laboratory animals. Lea and Febriger, Phi
la del phia, 1.970.

Lehn-Jensen and Rall W.F. Theriogenology, vol. 17,
nº 1, 1.982

Maurer R.R., Van Vleck C.D. and Foote R.H., J.Re-
prod. Fertil., 15, 171, 1.968.

Maurer R.R. and Haseman J.K., Biol. Reprod., nº14,
256, 1.976.

Parvex R., IX Congreso Inter. de Reprod. Animal ,
Madrid 1.980.

Parvex R., These Doctorel, Université Pierre et -
Marie Curie, Paris, 1.982

Renard J.P., Garnier V. y Parvex R., III Journees
de la Recherche Cunicole en France, T. I, 1.982

Roldán E.R.S., Morgan C. y Merani M.S. Rev. Med.-
Vet., 60, nº 5, 287, 1.979.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es el de establecer una técnica rutinaria de superovulación, recogida y transferencia de embriones en el conejo doméstico, así como tratar de simplificar y mejorar los resultados de las técnicas de conservación en nitrógeno líquido.

Se ha obtenido una media de embriones por -- animal de $28'8 \pm 9'7$; $17'2 \pm 11'2$ y $3 \pm 0'7$ mediante la utilización de dos agentes foliculoestimulantes : FSG y PMSG, este último en dos variantes de administración: la primera en dosis única, cuya respuesta estaba por debajo de la media fisiológica, y la segunda administrada seriadamente en la que, a pesar de resultar sensiblemente aumentada esta media, solo el 50% de los animales respondió de forma superovulatoria.

El desarrollo embrionario in vitro a las 24 horas fué del 60'8% (76/125) y a las 48 horas continuaron el desarrollo el 63% (48/76) de los embriones.

Se aplicó el proceso de congelación a 84 embriones de los cuales el 26% (7/27) se desarrollaron in vitro. Consiguiéndose la implantación en el 50% - de los casos en los que se realizó la transferencia, sin previo cultivo, a conejas receptoras pseudogestantes.