

INFLUENCIA DEL GENOTIPO MATERNO SOBRE LA SUPERVIVENCIA PRE-POSTNATAL EN CONEJOS SELECCIONADOS POR VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

INFLUENCE OF MATERNAL GENOTYPE ON PRE-POSTNATAL SURVIVAL IN RABBITS SELECTED FOR GROWTH RATE

Valdes-Hernández J.^{1,3*}, Vicente J.S.¹, Miranda-Alejo J.C.², García-Domínguez X.¹, Delgado-Bermejo J.V.², Marco-Jiménez F.¹

¹Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, España. *jesusvaldeshernandez@yahoo.com.

²Departamento de Genética Cuantitativa, Universidad de Córdoba, Grupo de Investigación de Recursos Genéticos (PAIAGR-218), España.

³Departamento de Ciencia Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

Keywords: Superovulation; Embryos; Probit link; Embryo transfer.

Palabras clave: Superovulación; Embriones; Función probit; Transferencia embrionaria.

ABSTRACT

Our objective was to evaluate the effect of three maternal genotypes on pre-postnatal survival. Nulliparous donors from line R (n=39) were superovulated with one subcutaneous injection of corifollitropin alfa (0.75 mg/kg). Consequently, 60 h later these females were inseminated and induced to ovulate, and embryos were recovered after 72 h of insemination. Thirteen donors were used since they produced a minimum of 21 embryos good quality according to morphological criteria. Individual embryo numbers from each donor were equitably transferred (7-14 embryos) to three multiparous recipient lines (R, A and V). A total of 453 embryos (151/each line) were transferred by laparoscopy to 39 multiparous rabbits. In the prenatal stage, embryonic survival rate (ESR) was determined at 10 days of gestation, as well as the gestational survival rate at birth (GSR). During postnatal stage (until age of 63 days), lactation survival (LSR) and fattening survival (FSR) rates were calculated. Statistical analysis was performed using a GLM of binary response (probit link with binomial error distribution), and comparison of means was performed with Wald test. Our results indicate an influence ($P < 0.05$) of maternal genotype on ESR, where both maternal lines (A and V) were superior in at least 11 % vs. line R ($0.62^a \pm 0.04$ -A and $0.58^a \pm 0.04$ -V vs $0.47^b \pm 0.04$ -R). However, this effect is lost ($P \geq 0.05$) when GSR (0.33 ± 0.04 -R vs 0.34 ± 0.04 -A and 0.32 ± 0.04 -V), SLR (0.81 -R ± 0.06 vs 0.86 ± 0.06 -A and 0.83 ± 0.06 -V), and FSR (0.78 ± 0.07 -R vs 0.79 ± 0.07 -A and 0.80 ± 0.07 -V) were analyzed. In conclusion, maternal genotype significantly affects embryonic survival, but not gestational survival or postnatal survival in rabbits.

RESUMEN

Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de tres genotipos maternos en la supervivencia pre-posnatal. Donantes nulíparas de una línea R (n=39) fueron superovuladas con una inyección subcutánea de corifolitropina alfa (0.75 µg/kg). Sesenta horas después, fueron inseminadas e

inducidas a ovular, recuperándose los embriones a las 72 h. Se utilizaron 13 donantes ya que produjeron un mínimo de 21 embriones de buena calidad según criterios morfológicos. La dotación embrionaria individual de cada donante fue transferida equitativamente (7-14 embriones) en las tres líneas de receptoras múltiparas (R, A y V). Se transfirieron un total de 453 embriones (151/cada línea) en las 39 receptoras mediante laparoscopia. El análisis estadístico fue realizado con un modelo lineal generalizado de respuesta binaria (probit link con una distribución binomial del error), y la comparación de medias se realizó con el test Wald. Nuestros resultados indican una influencia ($P < 0.05$) de ambas líneas maternas (A y V) sobre la tasa de supervivencia embrionaria con una superioridad de al menos un 11 % vs la línea R ($0.62^a \pm 0.04$ -A and $0.58^a \pm 0.04$ -V vs $0.47^b \pm 0.04$ -R). Sin embargo, este efecto se pierde ($P > 0.05$) cuando se analiza la supervivencia gestacional (0.33 ± 0.04 -R vs 0.34 ± 0.04 -A y 0.32 ± 0.04 -V); así como en la supervivencia en lactación (0.81 ± 0.06 -R vs 0.86 ± 0.06 -A y 0.83 ± 0.06 -V) y supervivencia en engorde (0.78 ± 0.07 -R vs 0.79 ± 0.07 -A y 0.80 ± 0.07 -V). En conclusión, el genotipo materno afecta significativamente la supervivencia embrionaria, pero no la supervivencia gestacional, ni la supervivencia posnatal.

INTRODUCCIÓN

Los componentes de tamaño de la camada y sus caracteres relacionados en conejos, aún siguen estando poco estudiados en líneas seleccionadas por velocidad de crecimiento. Varios estudios han relacionado la supervivencia prenatal con el genotipo materno, mientras que otros sugieren que el genotipo embrionario podría modificar las secreciones uterinas, por lo que la supervivencia prenatal ya no depende exclusivamente de factores maternos. En conejos, se reporta que la supervivencia fetal (FS) depende principalmente del genotipo materno, y que el genotipo embrionario sólo afecta la supervivencia fetal cuando el embrión es transferido a un ambiente materno favorable (Mocé *et al.*, 2004). Sin embargo, Vicente *et al.* (2013) muestran una influencia del tipo genético embrionario en las tasas de implantación y fetal; mientras que el tipo genético materno afectaba a la tasa de implantación. También es conocido que la mortalidad posnatal en conejos se produce principalmente desde el nacimiento hasta el destete, siendo la mortalidad al parto la causa más frecuente; aunque en el post-destete las diarreas y otras causas desconocidas pueden representar considerables pérdidas económicas. A pesar de que los estudios han proporcionado evidencias sobre el efecto de ambos factores (genotipo materno y embrionario), así como su efecto de interacción durante la etapa temprana de vida; no se ha podido discernir quien tiene el mayor peso sobre el carácter de supervivencia; si bien “el genotipo embrionario o el genotipo materno”. Nuestro estudio presenta un modelo para evaluar por separado el efecto materno, donde el genotipo materno está jerarquizado al genotipo embrionario. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar la influencia del tipo genético materno sobre la supervivencia prenatal y posnatal en conejos seleccionados por velocidad de crecimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la granja experimental del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA) perteneciente a la Universidad Politécnica de Valencia, cuya duración fue desde septiembre de 2015 hasta junio de 2016. Se utilizaron un total de 78 conejas de tres tipos genéticos (39 donantes nulpáras de una línea R y 39 receptoras múltiparas: línea A, V y R; respectivamente). Los tipos genéticos maternos (A y V) fueron seleccionados respectivamente desde 1980 para el caso de la línea neozelandesa (línea A) por un índice familiar basado en el

tamaño de camada al destete, y desde 1982 para el caso de la línea sintética (línea V) para incrementar el tamaño de camada al destete (Estany *et al.*, 1989). Estas líneas se utilizaron como referencia, porque los componentes del tamaño de la camada y las pérdidas gestacionales han sido bien caracterizados en estudios anteriores (García & Baselga, 2002). Mientras que el tipo genético paternal (línea R) fue seleccionado a partir 1990 por selección individual de la ganancia media diaria, desde el destete hasta la edad de sacrificio (63 días, Estany *et al.*, 1992), siendo utilizada a manera de grupo control. Todos los animales se mantuvieron bajo las mismas condiciones de crianza, acorde a la normativa de bienestar animal publicadas en el Real Decreto Español 53/2013. Se transfirieron un total de 453 embriones en 13 receptoras de cada línea (151 embriones/tipo genético) en estadio de mórulas o blastocito temprano a las 72 horas post-ovulación. Para ello, la producción de embriones consistió en aplicar superovulación con una sola dosis de corifolitropina alfa de larga acción (0.75 µg/kg) por vía subcutánea. Sesenta horas después, fueron inseminadas artificialmente (IA) con el eyaculado completo procedente de cada macho individual según control de parentesco. La calidad seminal fue evaluada garantizando una motilidad superior al 75 % y un nivel de morfoanomalías inferior al 25 %. La inducción de la ovulación (IO) se logró aplicando acetato de buserilina (1 µg/coneja), recuperándose los embriones 72 h después de la IA. De un total de 39 donantes, fueron empleadas 13 ya que produjeron entre 21 y 42 embriones de buena calidad según criterios morfológicos. La dotación individual de embriones recuperados de cada donante seleccionada, fue distribuida equitativamente (7-14 embriones) y trasferidos mediante la técnica de laparoscopia (Besenfelder & Brem, 1993) en las respectivas receptoras (R, A y V). En todos los casos se registró la identificación de la donante y receptora, cantidad de embriones transferidos (ET), así como la respectiva tasa de ovulación de la receptora. Durante la realización de esta técnica se aplicó una sedación-inducción con una dosis previa sinérgica (5 mg/kg de xilazina + 20 mg/kg de ketamina), para reducir el estrés y el miedo a la manipulación. La asincronía se controló sincronizando a las receptoras a la par de la inseminación artificial de las donantes, para ello se aplicó acetato de buserilina con una dosis de 1 µg/coneja. Las determinaciones consistieron en un recuento de los embriones implantados (EI) mediante laparoscopia una semana después de la transferencia de embriones. Tras producirse el parto se registró el número total de gazapos nacidos (NT), nacidos vivos (NV) y nacidos muertos (NM), además, se identificó cada gazapo con un microchip. Durante las etapas de lactación (0-28 días) y engorde (28-63 días), se registraron respectivamente los gazapos destetados (GD) y gazapos que alcanzan la edad sacrificio (GS). Las variables (ET, EI, NV, GD y GS) fueron registradas en escala dicotómica, tomando como posibles categorías: 1 (suceso positivo-vivo) y 0 (suceso negativo-muerto). Esto permitió expresar las siguientes variables:

- Supervivencia embrionaria (SE): definida como el número de embriones implantados respecto de los embriones trasferidos.
- Supervivencia gestacional (SG): definida como el número de individuos nacidos vivos respecto de los embriones implantados.
- Supervivencia en lactación (SPL): definida como el número de gazapos destetados respecto de los nacidos vivos.
- Supervivencia en engorde (SPE): definida como el número de gazapos que alcanzan la edad sacrificio respecto de los gazapos destetados.

El análisis estadístico consistió en aplicar un modelo lineal generalizado de respuesta binaria (probit link con una distribución binomial del error), y la comparación de medias se realizó con la

prueba Wald; utilizando el software estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es conocido que factores genéticos y ambientales regulan la supervivencia prenatal (Santacreu, 2006). En la línea R, nuestros resultados indican la existencia de un significativo efecto materno, pero no relevante sobre la supervivencia embrionaria. En adición, ambos tipos genéticos maternos (A y V) presentaron un mayor porcentaje de embriones implantados, superando al tipo genético paterno (R) en al menos un 11 %. Sin embargo, el efecto materno no fue significativo sobre la tasa de supervivencia gestacional, así como en la supervivencia postnatal durante las etapas de lactación y engorde (tabla I: SE, SG; tabla II: SPL y SPE, respectivamente).

Tabla I. Valores medios \pm S.E para la tasa de supervivencia embrionaria (SE) y supervivencia gestacional (SG) según el efecto del genotipo materno (*Mean values \pm S.E for embryonic survival and gestational survival rates according to effect of maternal genotype*).

Variable	Genotipo materno		
	Línea R	Línea A	Línea V
SE	0.47 ^b \pm 0.04	0.62 ^a \pm 0.04	0.58 ^a \pm 0.04
SG	0.33 \pm 0.04	0.34 \pm 0.04	0.32 \pm 0.04

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). La covariable que aparece en el modelo se evalúa en el valor siguiente: EI = 6.76 con un $b = 0.05 \pm 0.012$ tasa/SG.

Tabla II. Valores medios \pm S.E para las tasas de supervivencia durante las etapas de lactación (SPL) y engorde (SPE) según el efecto del genotipo materno (*Mean values \pm S.E for survival rates during lactation (SPL) and fattening (SPE) stages according to effect of maternal genotype*).

Etapa	Genotipo materno			
	Línea R	Línea A	Línea V	Global
Lactación (SPL)	0.81 \pm 0.06	0.86 \pm 0.06	0.83 \pm 0.06	0.83 \pm 0.06
Engorde (SPE)	0.78 \pm 0.07	0.79 \pm 0.07	0.80 \pm 0.07	0.79 \pm 0.07

Estos resultados son referidos a estas dos etapas sin apreciarse diferencias significativas ($p > 0.05$). La covariable que aparece en el modelo se evalúa en el valor siguiente: NV = 6.51 con un $b = 0.011 \pm 0.016$ tasa/NVL y 6.55 con un $b = -0.022 \pm 0.014$ tasa/NVE; respectivamente para la etapa de lactación y engorde ($p < 0.05$).

Acorde a nuestro modelo se intentó separar los efectos del tipo genético materno y embrionario, transfiriendo un único tipo embrionario sobre varios tipos genéticos maternos. En relación a ello, los estudios previos en conejo utilizaban la transferencia recíproca de embriones entre líneas o razas para separar los diferentes efectos (Naturil-Alfonso *et al.*, 2015). Sin embargo, una limitante de estos estudios es que sólo permiten la comparación entre dos ambientes. No obstante, nuestro modelo implica el uso de un tratamiento de superovulación, y estudios previos han demostrado una marcada variabilidad de la calidad embrionaria (Viudes-de-Castro *et al.*, 2009). Además han sido asociados con una menor supervivencia embrionaria y fetal en conejos (desde la implantación hasta el día 18 de gestación, Badawy *et al.*, 2016). En nuestro caso, empleamos FSH recombinante de acción prolongada (corifolotropina alfa) como un método simplificado de administración. Nuestros resultados no son comparables con trabajos previos ya que, bajo nuestro

conocimiento, el uso de este principio activo no ha sido descrito hasta la fecha en conejos seleccionados por velocidad de crecimiento. Nuestros resultados están en cierta forma condicionados por el tipo genético de la línea R, mismo que presenta características peculiares desde el punto de vista reproductivo, como es un tamaño de camada a nacimiento y destete de alrededor de 7 y 6 respectivamente, un elevado porcentaje de fallos en la inducción de la ovulación post-coital (45 %) debido a una baja concentración de LH (Naturil-Alfonso *et al.*, 2016), una baja tasa de implantación y un porcentaje muy elevado de pérdidas fetales y gestacionales (Vicente *et al.*, 2012). No obstante, si nos basamos en los resultados obtenidos en términos de implantación y de supervivencia a parto, estos son ligeramente inferiores a los observados en estudios anteriores empleando transferencia recíproca de embriones (Naturil-Alfonso *et al.*, 2015). La principal diferencia entre este diseño experimental y los anteriores, es el uso de hembras múltiparas como receptoras, lo que podría explicar en parte estas diferencias ya que las gestaciones con embriones trasferidos son menores en animales múltiparos. Otra posible explicación a las elevadas pérdidas de la línea R, sería los niveles bajos de receptores de IGF-II (Llobat *et al.*, 2012). En cuanto a la supervivencia postnatal (tabla II), encontramos que independientemente del tipo de efecto materno durante las etapas de lactación y engorde; el comportamiento fue similar con valores medios de 83 % de SPL y un 79 % de SPE, datos acorde con los descritos en conejo (Pérez, 2015).

CONCLUSIONES

Existe una influencia del efecto materno en la supervivencia prenatal, observando este efecto sobre la supervivencia embrionaria, pero no sobre la supervivencia gestacional. Asimismo, no se observó efecto significativo en la supervivencia postnatal desde la lactación hasta el engorde.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al soporte del Proyecto de Investigación Español (AGL2014-53405-C2-1-P).

BIBLIOGRAFÍA

- Badawy, A., Peiró, R., Blasco, A., & Santacreu, M. (2016). Effect of increased ovulation rate on embryo and foetal survival as a model for selection by ovulation rate in rabbits. *World Rabbit Science*, 24(2), 87–94.
- Besenfelder, U., & Brem, G. (1993). Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99(1), 53–56.
- Estany, J., Baselga, M., Blasco, A., & Camacho, J. (1989). Mixed model methodology for the estimation of genetic response to selection in litter size of rabbits. *Livestock Production Science*, 21(1), 67–75.
- Estany, J., Camacho, J., Baselga, M., & Blasco, A. (1992). Selection response of growth rate in rabbits for meat production. *Genetics Selection Evolution*, 24(6), 527–537.
- García, M., & Baselga, M. (2002). Estimation of genetic response to selection in litter size of rabbits using a cryopreserved control population. *Livestock Production Science*, 74(1), 45–53.
- Llobat, L., Marco-Jiménez, F., Peñaranda, D., Thieme, R., Navarrete, A., & Vicente, J. (2012). mRNA expression in rabbit blastocyst and endometrial tissue of candidate gene involved in gestational losses. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2), 281–287.
- Mocé, M., Santacreu, M., Climent, A., & Blasco, A. (2004). The effect of divergent selection for uterine capacity on prenatal survival in rabbits: Maternal and embryonic genetic effects. *Journal of Animal Science*, 82(1), 68–73.
- Naturil-Alfonso, C., Lavara, R., Vicente, J., & Marco-Jiménez, F. (2016). Effects of Female Dietary Restriction in a

- Rabbit Growth Line During Rearing on Reproductive Performance and Embryo Quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(1), 114–122.
- Naturil-Alfonso, C., Marco-Jiménez, F., Jiménez-Trigos, E., Saenz-de-Juano, M., Viudes-de-Castro, M., Lavara, R., & Vicente, J. (2015). Role of Embryonic and Maternal Genotype on Prenatal Survival and Foetal Growth in Rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(2), 312–320.
- Pérez, R. (2015). Estudio de la supervivencia de los gazapos desde el nacimiento hasta el destete en varias líneas de selección en conejos. Retrieved January 30, 2016, from <https://riunet.upv.es/handle/10251/55740>.
- Santacreu, M. (2006). La supervivencia prenatal de una coneja reproductora. In A. E. de C. (ASESCU) (Ed.), *XXXI Symposium de cunicultura* (pp. 229–236). Ayuntamiento de Lorca.
- Vicente, J., Llobat, L., Jiménez-Trigos, E., Lavara, R., & Marco-Jiménez, F. (2013). Effect of embryonic and maternal genotype on embryo and foetal survival in rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(3), 402–6.
- Vicente, J., Llobat, L., Viudes-de-Castro, M., Lavara, R., Baselga, M., & Marco-Jiménez, F. (2012). Gestational losses in a rabbit line selected for growth rate. *Theriogenology*, 77(1), 81–88.
- Viudes-de-Castro, M., Cortell, C., Mocé, E., Marco-Jiménez, F., Joly, T., & Vicente, J. (2009). Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments. *Theriogenology*, 72(5), 655–62.