

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



***EFECTO DE LA SELECCIÓN POR GANANCIA  
MEDIA DIARIA DURANTE EL ENGORDE  
SOBRE EL CRECIMIENTO PRENATAL Y  
POSTNATAL EN CONEJO***

**TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y  
DEL MEDIO RURAL**

**ALUMNO: VICENTE ESTARLICH CALATAYUD**

**TUTOR: PROF. D. FRANCISCO MARCO JIMÉNEZ**

***Curso académico: 14/15***

**VALENCIA, JULIO de 2015**





**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

**Escuela Técnica Superior de Ingeniería**



**Agronómica y del Medio Natural**

**Título del TFG:** Efecto de la selección por ganancia media diaria durante el engorde sobre el crecimiento prenatal y postnatal en conejo.

**Alumno:** Vicente Estarlich Calatayud

**Tutor Académico:** Prof. D. Francisco Marco Jiménez

Valencia, Julio de 2015.

## **RESUMEN**

Desde la antigüedad, la selección ha sido una herramienta utilizada por la humanidad para obtener ejemplares con características interesantes desde el punto de vista productivo, en especies tanto animales como vegetales. Actualmente, existen programas de mejora genética de infinidad de especies que utilizan distintos métodos de selección para conservar los mejores individuos, para posteriormente reproducirlos y poder seguir mejorando las líneas. Debido al gran valor genético que adquieren los individuos tras años de selección y a la posibilidad de su pérdida que supondría un atraso, se establecieron los bancos de material genético, en los que entre otras modalidades de almacenamiento se encuentran los embriones vitrificados en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Por ello, se ha realizado este trabajo con el fin de evaluar el almacenamiento de los embriones vitrificados en nitrógeno líquido y el de 15 años de selección por ganancia de peso media diaria en el engorde de la línea R de conejos, de la Unidad de Mejora Genética de la UPV.

Se utilizaron un total de 534 embriones, de dos generaciones distintas de la línea R (18 y 36), de los que 301 fueron utilizados como control (generación 36) y los 233 restantes como problema. Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas en el crecimiento postnatal hasta el destete, ya que ambos muestran curvas de crecimiento paralelas y prácticamente superpuestas. Sin embargo, sí existen diferencias significativas en el crecimiento prenatal, siendo los fetos de la generación 36 más largos. Aparecen también diferencias en

cuanto al tiempo de almacenamiento de los embriones, pues los de la generación 18, vitrificados en el año 1999, mostraron una menor tasa de disponibilidad que los de la 36, vitrificados en 2014 y por tanto una menor eficiencia de crioconservación. Esto último estuvo favorecido por la pérdida de dos pajuelas que explotaron durante la desvitrificación.

#### **PALABRAS CLAVE**

Conejo, embrión, nitrógeno líquido, selección, vitrificación.

#### **ABSTRACT**

From a long time ago, selection has been a tool used by the humanity to obtain offspring with interesting features from a productive point of view, including both animal and vegetable species. Currently, there are breeding programs of many species that use different selection methods to preserve the best individuals, in order to reproduce them and to be able to improve the lines. Due to the high genetic value that individuals achieve after years of selection and the possibility of its loss which could suppose a delay, banks of genetic material were established. In these banks, embryos are vitrified and stored in liquid nitrogen to  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Therefore, this work has been carried out in order to evaluate the current vitrified embryos and those vitrified and stored 15 years ago from a rabbit line selected by daily average gain in the fattening period, of the Genetic Progress Unit in the UPV.

In this work a total of 534 embryos were used, from two different generations of R line (18 and 36). From these 534, 301 were used as control (generation 36) and the 233 remaining as problem (generation 18). The results obtained showed that there were no significant differences in the post native growth up to the weaning, since both generations showed parallel and practically superposed growth curves. Nevertheless, there were significant differences in the prenatal growth, being the fetuses from the generation 36 longer than the generation 18. There were also differences in the time of storage of the embryos, since those from 18 generation, vitrified in 1999 showed less availability than those from generation 36, vitrified in 2014 and therefore a less cryopreservation efficiency. The above mentioned was favored by the loss of two straws that exploded during the warming procedure.

#### **KEY WORDS**

Embryos, liquid nitrogen, rabbit, selection, vitrified.

# AGRADECIMIENTOS

Llegado a este punto, es momento de dar las gracias a todas las personas que han dedicado parte de su tiempo a este trabajo y a los que lo han sufrido.

En primer lugar, agradecerle a Paco la oportunidad de realizar este trabajo y enseñarme que lo importante es la calidad y no la cantidad.

También a José, Estrella, Carmen, Amparo y Luis por la acogida en el departamento y por buscar siempre un hueco para atender cualquier duda o problema que se presentara.

A Isabel, por todas esas horas midiendo ecografías y pasando las medidas a la base de datos, sin descanso y con el ánimo que la caracteriza.

Y a David y Simon por prestarse a hacer las tareas del piso cuando parecía que las ecografías se reproducían y nunca acababan; como dice David, nuestra segunda familia.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Producción cunícola.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Situación actual.....	1
1.1.2 Cruce a tres vías.....	4
1.1.3 Líneas de conejos en general.....	5
1.1.4 Líneas Universidad Politécnica de Valencia (UPV).....	5
1.1.5 Otras líneas españolas.....	6
1.1.6 Líneas italianas.....	6
1.1.7 Líneas francesas.....	6
<b>1.2 Conservación de líneas.....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Importancia.....	7
<b>1.3 Reconstitución de poblaciones.....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Modelo ratón y rata.....	8
1.3.2 Trabajos hechos en el modelo conejo.....	9
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Animales y material biológico.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Desvitrificación.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Transferencia.....</b>	<b>13</b>
<b>3.4 Implantación embrionaria.....</b>	<b>14</b>
<b>3.5 Medición de la longitud de los fetos.....</b>	<b>15</b>
<b>3.6 Control de partos.....</b>	<b>15</b>
<b>3.7 Control de ganancia de peso.....</b>	<b>16</b>
<b>3.8 Análisis estadístico.....</b>	<b>16</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>5. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>22</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resultados de la comparación categórica entre la generación 7 y la 17 de la línea R.....	10
<b>Tabla 2.</b> Pérdidas totales en el período de gestación y eficiencia de crioconservación de las generaciones 7 y 17 de la línea R.....	11
<b>Tabla 3.</b> Resultados de la comparación categórica entre la generación 18 y la 36 de la línea R.....	18
<b>Tabla 4.</b> Pérdidas en el período de gestación y eficiencia de crioconservación.....	19
<b>Tabla 5.</b> Comparación de la ganancia media hasta el destete entre la generación 18 y la 36.....	20

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Producción mundial de carne de conejo (2005).....	2
<b>Figura 2.</b> Distribución de los censos de conejos por CCAA en 2013.....	3
<b>Figura 3.</b> Esquema del cruce a tres vías.....	4
<b>Figura 4.</b> Ejemplar californiano.....	5
<b>Figura 5.</b> Ejemplar neozelandés.....	5
<b>Figura 6.</b> Líneas de cruce para la obtención de hembras F1 estándar de Grimaud Frères Sélection.....	7
<b>Figura 7.</b> Ejemplar macho de la línea R de la UPV.....	13
<b>Figura 8.</b> Imagen de la cánula entrando en el infundíbulo.....	14
<b>Figura 9.</b> Imagen de las vesículas uterinas a 10 días.....	14
<b>Figura 10.</b> Medición de la longitud de un feto.....	15
<b>Figura 11.</b> Camada de gazapos de un día.....	16
<b>Figura 12.</b> Toma del peso de un gazapo.....	16
<b>Figura 13.</b> Comparación de crecimiento fetal entre la generación 18 y la 36.....	19

# 1. INTRODUCCIÓN

---



## 1.1 Producción cunícola

### 1.1.1 Situación actual

Con el fin de satisfacer el elevado ritmo de crecimiento de la población y el aumento en la demanda de proteína, se ha considerado incrementar la producción de carne con animales herbívoros de ciclo de vida corto, como los conejos ya que estos pueden criarse con dietas a base de forrajes y subproductos agrícolas, tienen un rápido crecimiento, son prolíficos, su carne es considerada de muy buena calidad y pueden explotarse tanto en sistema familiar como comercial (Lebas, 1983). La cunicultura tradicional responde perfectamente a los criterios de sostenibilidad requeridos para todo tipo de proyectos de desarrollo, razón por la cual la FAO y las organizaciones de desarrollo gubernamentales y no gubernamentales apoyaron firmemente los proyectos de cunicultura en países en desarrollo (Lebas *et al.* 1996).

El peculiar sistema digestivo del conejo ha permitido alimentar a esta especie con subproductos vegetales e industriales de todo tipo (González y Piquer, 1994). Además, puede asimilar con facilidad parte de las proteínas contenidas en las plantas ricas en celulosa, mientras que las aves, únicos animales que dan mejores resultados a nivel de rendimientos, disminuyen su rentabilidad cuando son nutridos con alimentos celulósicos. Por otra parte el consumo de alimentos clásicos por estos animales (cereales, torta de soja) compite con el consumo alimentario humano, por lo que para los países en los que no existen excedentes de cereales, la producción de conejos podría resultar particularmente interesante (Lebas *et al.* 1996).

Los rendimientos productivos que se obtienen actualmente en conejas reproductoras criadas en condiciones intensivas son similares a los que se consiguen en otras especies de animales domésticos, debido a los avances existentes en genética, manejo, instalaciones, condiciones sanitarias y alimentación (de Blas y Nicodemus, 2001).

El potencial productivo de esta especie le permite competir en condiciones de explotación intensiva con otros monogástricos como el cerdo. En cuanto a su potencial de crecimiento, el conejo muestra un crecimiento inferior al pollo pero superior al cerdo. Un conejo es capaz de multiplicar por 40 su peso al nacimiento en 10 semanas, mientras que un pollo necesitaría la mitad de tiempo y un cerdo 6 semanas más. En cuanto a la capacidad reproductiva, la situación es similar a la expuesta para el crecimiento. Una coneja de 4 kg de peso vivo desteta al año 48-50 gazapos (de 7 a 8 veces su peso), mientras que una cerda (230 kg de peso vivo) desteta la mitad de lechones (21-22 lechones/ hembra y año) con un peso total que supone un 60% de su peso. Así, mientras que en pollos la velocidad de crecimiento casi se ha triplicado y el índice de conversión se ha reducido a la mitad, en conejos estas mejoras sólo suponen entorno a un 20-

## 1. INTRODUCCIÓN

30%. Respecto a la reproducción, en cerdos casi se ha duplicado la producción de lechones destetados por cerda y año, mientras que en conejos este parámetro sólo se ha incrementado en un 50%. Una parte importante de estas mejoras se deben a cambios en el manejo de la explotación, pero otra se debe a la mejora genética de los animales que están presentes en la granja. Al contrario de lo que ha ocurrido en otras especies, en conejos, la creación de poblaciones especializadas en distintos caracteres productivos es relativamente reciente. Esto justifica, en parte, los menores incrementos en productividad con respecto a otras especies (Carabaño, 2003).

Se estima la producción en 1.5 millones de toneladas de canales de conejo en el mundo, lo que daría un consumo anual por habitantes estimado en 280 g de carne pero este cálculo es teórico puesto que, en gran número de países, el consumo es nulo para la mayoría de los habitantes mientras que alcanza casi 10 kg por año entre los campesinos franceses y 15 kg por año entre los habitantes de Nápoles (Lebas y Colin 1992). Europa aporta el 75 % de la producción mundial, siendo China la segunda fuente de producción, aunque existen criaderos en algunas regiones de África, América central o en el Asia sudoriental (Indonesia) (Lebas *et al.* 1996). Según la FAO, España ocupa el quinto lugar a nivel mundial en producción de carne de conejo, por detrás de China, Venezuela, Italia y Corea del Norte, estando muy igualada con Egipto (COAG, 2013).

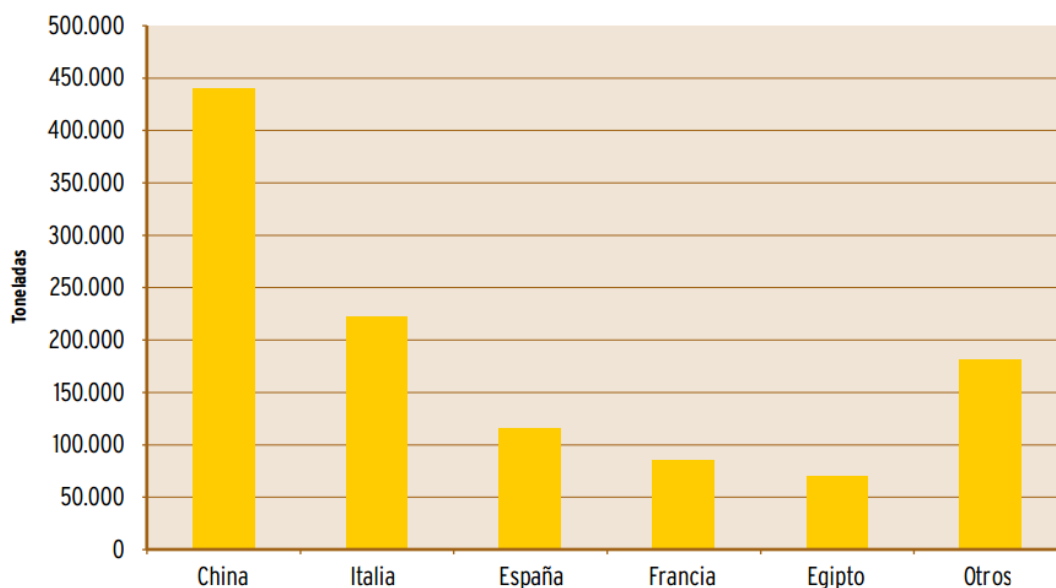


Figura 1. Producción mundial de carne de conejo (2005).

El sector cunícola ocupa el quinto lugar en importancia económica dentro de la producción cárnica estatal, y supone el 1,1% del volumen total de carne obtenida y el 1,3% del valor de la misma. A nivel estatal el número de explotaciones cunícolas ha disminuido en un 30% en los

# 1. INTRODUCCIÓN

últimos 6 años, pasando de 5.195 explotaciones en el 2007 a 3.642 en Abril del 2012. Sin embargo, el número de cabezas de conejos registradas en el REGA ha repuntado en ese mismo periodo en un 12,5%, pasando de 5,4 millones de cabezas en el 2007 a 6,12 millones en el 2012. De estos 6,1 millones de cabezas, 4,6 millones (un 76%) se corresponden con el cebo, 984.274 con hembras reproductoras, 221.523 con reposición, 38.686 con machos reproductores y 249.595 con otros. Esta coyuntura indica que algunas explotaciones han ganado en dimensión, para albergar una mayor cantidad de conejos, mientras que explotaciones de pequeña capacidad han cerrado (COAG, 2013).

En España la cría del conejo comienza a modernizarse en los años 50, evolucionando en los 60 y 70 hacia la cría industrial. La producción de carne de conejo es estacional alcanzando sus mínimos entre octubre y enero y sus máximos entre junio y septiembre (MARM, 2015). En la actualidad, el conejo se explota económicamente para la producción de carne y también para la producción de piel y pelo, aunque esta segunda aptitud suele ser un producto secundario en la mayoría de los casos. También es utilizado como animal de compañía (razas enanas), de experimentación y para la realización de repoblaciones cinegéticas (conejo silvestre) (MARM, 2015).

España es un país con gran tradición en el consumo de carne de conejo y con un censo de granjas notable frente al resto de países europeos, aunque dentro de la producción ganadera total es un sector más bien modesto. La producción cunícola europea se concentra en tres países principalmente: Francia, Italia y España (MARM, 2015).

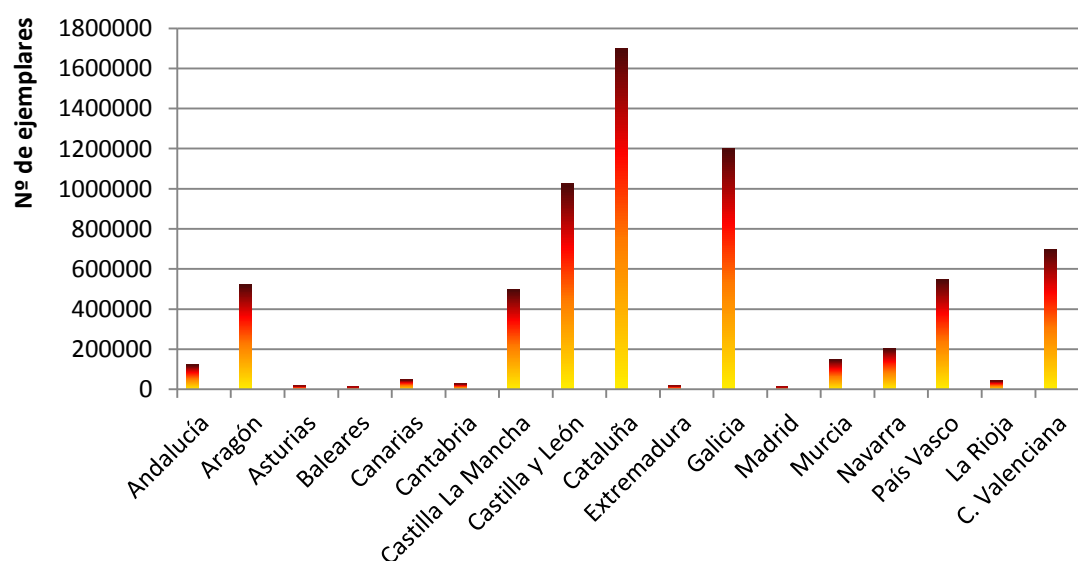


Figura 2. Distribución de los censos de conejos por CCAA en 2013.  
Fuente: Elaboración propia con datos MAGRAMA (COAG, 2013).

En los países latinos, tradicionalmente consumidores de conejo, la aceptación de la carne de este animal no plantea problemas. Dicha carne está situada entre las carnes más buscadas, se consume en familia los días de fiesta. En los países anglosajones, tradicionalmente no se consume conejo, está asociado a la carne ‘de la guerra’, la de los periodos de escasez alimentaria (Lebas *et al.* 1996).

## 1.1.2 Cruce a tres vías

El cruzamiento es una manera de aumentar la producción, en la que se combinan las diferencias entre las líneas o razas de interés para crear nuevas razas (Rhoad, 1949; Porter, 1993), (Gregory *et al.*, 1991; Youssef *et al.*, 2008). En especies prolíficas, el cruce a tres vías o doble cruzamiento es el sistema más comúnmente utilizado ya que permite un uso más flexible y completo de la complementariedad, la heterosis individual y la heterosis materna. Las hembras cruzadas aprovechan la complementariedad y la heterosis individual de las dos primeras líneas o razas y el producto final explota la heterosis individual entre la tercera línea o raza y las dos primeras, la heterosis materna entre las dos primeras y la complementariedad entre las tres, especialmente entre la tercera línea o raza y las demás. La tercera línea o raza, que generalmente es el padre del producto final, es comúnmente seleccionada debido a sus características buenas o extremas de crecimiento, conformación o cantidad de magro (Mínguez, 2014, Figura 3).

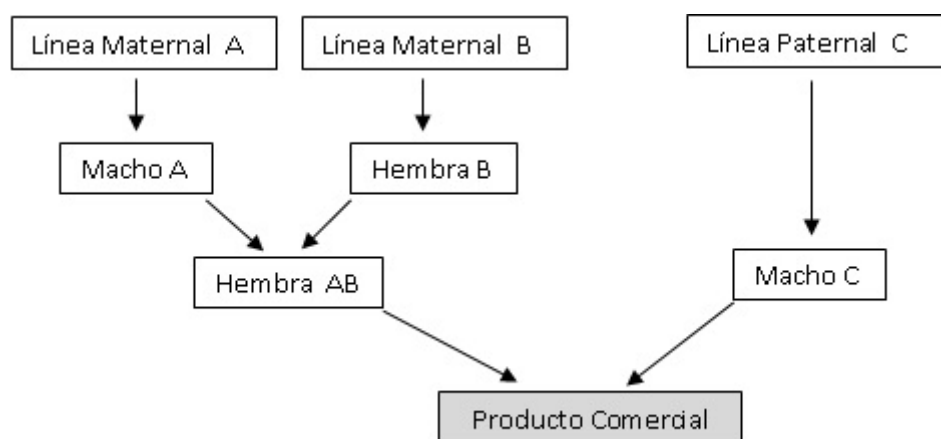


Figura 3. Esquema del cruce a tres vías.

En la producción cunícola, para obtener el gazapo de engorde se realizan dos cruzamientos con tres líneas especializadas. El primero de ellos es entre dos líneas maternas, para la producción

de la hembra cruzada. En el segundo, estas hembras cruzadas se montan o inseminan con machos de una línea paterna para obtener el gazapo de engorde. El criterio de selección de las líneas maternales en conejo de carne es normalmente el tamaño de camada al nacimiento o al destete. Sin embargo, es importante tener en cuenta cómo se ven afectados los caracteres de matadero en los cruces de estas líneas, ya que aportan un 50% de sus genes a los conejos destinados a matadero (Mínguez *et al.*, 2012).

### 1.1.3 Líneas de conejos en general

Las razas cunícolas se clasifican, según su peso adulto, en pesadas (más de 5 kg), medianas (3,5-4,5 kg), ligeras (2,5-3 kg) y enanas (alrededor de 1 kg). Para la producción de carne bajo sistemas intensivos, se emplean principalmente líneas obtenidas a partir de razas medianas. De estas razas las más difundidas son la Californiana y la Neozelandesa Blanca. La raza Californiana presenta capa blanca con extremos negros y ojos rojos. La raza Neozelandesa Blanca, que es la más explotada del mundo, presenta capa blanca y ojos rojos (González y Caravaca, 2015).



*Figuras 4 y 5. Ejemplar californiano a la izquierda y neozelandés a la derecha.*

### 1.1.4 Líneas Universidad Politécnica de Valencia (UPV)

Actualmente se están seleccionando cuatro líneas maternales, en las que el objetivo principal es la mejora del tamaño de camada al destete. Su selección se hace a través de la evaluación de los mejores apareamientos mediante un índice de selección familiar o a través de un BLUP con un modelo animal de repetibilidad. En el año 2015 el número de generaciones de selección acumuladas en estas líneas es: 46 en la línea A, 41 en la línea V, 24 en la línea H y 11 en la línea LP. También se dispone de una línea paterna, la línea R (generación 36) seleccionada por crecimiento diario post-destete para mejorar indirectamente el índice de conversión (ICTA-UPV, 2015).

### 1.1.5 Otras líneas españolas

La Unidad de Cunicultura del IRTA colabora estrechamente con el sector aportando conocimientos, tecnología y soluciones a productores, asociaciones y empresas. Dispone de dos líneas especializadas de conejos, una de ellas seleccionada por prolificidad desde el año 1992 denominada Prat (Gómez et al. 1996) y la otra seleccionada por crecimiento y conversión del pienso en carne denominada Caldes (Gómez et al. 2000).

### 1.1.6 Líneas italianas

El conejo Martini nace y se cría en un Centro de Genética del Conejo moderno e innovador donde fue impuesto un plan de hibridación único, basado en 4 líneas genéticas puras (Martini Zootechnical Division, 2015).

### 1.1.7 Líneas francesas

En Francia, la empresa Grimaud Frères Sélection, ha utilizado principalmente dos líneas para la obtención de sus hembras cruzadas estándar, la GD14 (antigua 1077) y la GD 24 (antigua 1066); y otras dos para la obtención de sus hembras pesadas, la GD34 y la GD44. Para los machos finalizadores utilizan diversos cruces entre líneas que dan lugar a ejemplares de características productivas muy interesantes y que la empresa denomina Hyplus. Hypharm continúa el desarrollo de los productos de esta empresa a través de sus dos núcleos de selección ubicados en la región de Maine-et-Loire. Uno se dedica a seleccionar líneas masculinas, el otro a las líneas femeninas, para asegurar la implementación de programas de mejora genética innovadora conjuntamente. Históricamente, el INRA – SAGA (Instituto Nacional Francés para la investigación agrícola que se unió a la unidad regional mejora genética animal) ha sido un ente asociado estrechamente con Hypharm en su trabajo de selección (Hypharm, 2015).



Figura 6. Líneas de cruce para la obtención de hembras F1 estándar de Grimaud Frères Sélection.

## 1.2 Conservación de líneas

### 1.2.1 Importancia

En los últimos 100 años se ha producido una pérdida neta de diversidad causada por un aumento en la tasa de extinción de razas y variedades. Solo en Europa y el Cáucaso se han extinguido ya 481 razas de mamíferos y 39 de aves, y están en situación de riesgo 624 especies de mamíferos y 481 de aves. Las pérdidas se han acelerado debido a la rápida intensificación de la producción agropecuaria, a la falta de evaluación de las razas locales, y a la sustitución o cruzamiento inapropiado de razas facilitado por la disponibilidad de razas de alto rendimiento y por las biotecnologías reproductivas (FAO, 2015). Las razas agropecuarias reflejan la identidad cultural e histórica de las comunidades que las desarrollaron, y han formado parte integral de la vida y tradiciones de muchas sociedades. La pérdida de razas típicas, por tanto, significa una pérdida de identidad cultural para las sociedades afectadas, así como una pérdida de parte del patrimonio de la humanidad. Otro argumento se relaciona con el hecho de que el desarrollo de una raza, especialmente en especies con largos intervalos generacionales, habrá implicado a menudo inversiones considerables en tiempo, gasto económico y/o recursos institucionales. (FAO, 2015).

Tisdell (2003) manifestaba que vista a largo plazo, es posible que la concentración de razas muy productivas pero muy sensibles al medioambiente cree un grave problema para la sostenibilidad de la producción agropecuaria. Es posible que los ganaderos pierdan la capacidad de manipular las condiciones medioambientales naturales. Si en el ínterin se pierden razas medioambientalmente tolerantes, se podría llegar a colapsar el nivel de producción agropecuaria.

La importancia de conservar los recursos zoogenéticos amenazados no solo está necesariamente relacionada con su potencial uso futuro en circunstancias cambiantes. Existe un conjunto de razones que explican por qué el uso de dichos recursos puede no ser actualmente óptimo. Dichas razones se engloban en tres categorías principales: déficit de información, fallos del mercado y distorsiones de las políticas (Mendelsohn, 2003). Las técnicas actualmente accesibles y económicamente viables para la conservación in vitro de recursos zoogenéticos incluyen la crioconservación de células reproductivas, embriones y tejidos. Ahora bien, dado que dichas tecnologías llevan relativamente poco tiempo de existencia, evaluar exactamente su potencial de longevidad está aún por demostrar (FAO, 2013).

Durante los últimos años, la técnica de vitrificación está siendo ampliamente utilizada en la conservación de embriones de especies ganaderas. La simplicidad de los procedimientos, la alta viabilidad de los embriones recuperados y el costo y eficacia de la instalación se ha traducido en un aumento de la vitrificación sobre el método de congelación lenta convencional en la mayoría de programas de conservación. Además, los bancos de embriones son una valiosa herramienta en los planes de mejora del ganado, donde el control de la población es necesario, con el fin de medir la tasa real de ganancia genética o preservar las líneas seleccionadas actuales. Como ejemplo, en la UPV se creó el banco de embriones de conejo en los años noventa. Desde entonces más de 10.000 embriones de las diferentes líneas seleccionadas han sido almacenados (Lavara et al., 2011).

La línea de producción y crioconservación de gametos y embriones para la difusión y conservación de recursos genéticos animales se inició en 1989 con el objetivo de establecer un banco de embriones de las líneas seleccionadas de conejo por el Grupo de Mejora Genética. Actualmente, los trabajos de investigación comprenden tanto el estudio de aquellos aspectos biológicos relacionados con la respuesta de los espermatozoides, óvulos y embriones a los procedimientos implicados en los programas de crioconservación (producción, conservación e inseminación o transferencia) como el desarrollo de las tecnologías más eficaces aplicables en diferentes especies ganaderas, ya sea para la conservación de recursos genéticos o para su difusión o su evaluación (ICTA-UPV, 2015).

## 1.3 Reconstitución de poblaciones

### 1.3.1 Modelo ratón y rata

Los primeros estudios de congelación de embriones de ratón fueron publicados en la revista "Science" en el año 1972 por David Whittingham y colaboradores, usando un método de congelación lenta.



Desde entonces son varios los trabajos realizados en The Jackson Laboratory y en el MRC Mammalian Genetics Unit que demuestran que los embriones de ratón pueden ser recuperados (viables) tras 20 años de almacenamiento. La mayoría de los esfuerzos para establecer bancos de embriones criopreservados, provenientes de modelos animales, están concentrados en tan sólo unos pocos centros internacionales (todos orientados hacia los estudios genéticos). Estos son, The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, Estados Unidos, <http://www.jax.org>), MRC Mammalian Genetics Unit (Harwell, Inglaterra, <http://www.mgu.har.ac.uk/>), NIH-Animal Genetic Resource (Bethesda, Maryland, Estados Unidos, <http://www.nih.gov/od/ors/dirs/vrp/nihagr.htm>), Central Institute for Experimental Animals (Kawasaki, Japón) y The European Mouse Mutant Archive (EMMA) y sus laboratorios asociados (Roma, Italia <http://www.emma.rm.cnr.it/>). Se calcula que un total de dos millones de embriones de ratón (correspondientes a alrededor de 3000 modelos) se encuentran congelados en los repositorios de estos centros. Existen aproximadamente 200 modelos de rata en el mismo estado de criopreservación (Secal, 2014). La criopreservación de líneas de ratón es un procedimiento altamente recomendable para mantener los modelos animales que se utilizan en los laboratorios de biología, biomedicina y biotecnología durante largo tiempo, en condiciones seguras y estables, sin necesidad de mantener animales vivos, con el consiguiente ahorro de espacio, dinero y la optimización del uso de animales para experimentación, de acuerdo con las normativas actuales de bienestar animal (CNB-CSIC, 2015).

El Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) es la sede del nodo español del proyecto europeo **EMMA** (*European Mouse Mutant Archive*) cuyo objetivo es la criopreservación, almacenamiento organizado y distribución coordinada de líneas de ratones de interés para la comunidad científica en biomedicina (CNB-CSIC, 2015).

### 1.3.2 Trabajos en el modelo conejo

La eficiencia de un programa de crioconservación según Vicente et al. (2003) depende de factores técnicos (inducción de la ovulación, recuperación y valoración de embriones, la criopreservación y almacenamiento y los procedimientos de transferencia), así como factores genéticos (donante y receptora).

Lavara et al. (2011) comprobaron las diferencias de supervivencia embrionaria entre tres períodos diferentes de almacenamiento (< 1 año, 3-5 años y >15 años), demostrando que no hay diferencias en el número de individuos nacidos.

## 1. INTRODUCCIÓN

Estudios realizados anteriormente dan tasas in vivo después de la desvitrificación basadas en la transferencia de un número similar de embriones criopreservados a partir de un pool proveniente de varias donantes. Sin embargo desde un punto de vista genético, en términos de establecer un grupo de control o la reconstitución de una población, el número de donantes con descendencia y la identificación de estas son importantes. En el estudio realizado por Lavara et al. (2011) los embriones transferidos pertenecían a la misma donante. Además, el número de embriones transferidos variaba entre cinco y catorce embriones por destinataria sobre transferencia unilateral. Los resultados mostraron que la tasa de preñez no fue influenciada por el número de embriones transferidos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Adams (1962) quien observó que la tasa de preñez no fue influenciada tanto por el número de embriones transferidos como si la transferencia fue unilateral o bilateral. Por otro lado, incrementando el número de embriones transferidos, la fertilidad al parto mostró un aumento significativo. Marco-Jiménez et al., (2013) demostraron que diferencias en las tasas de implantación, descendencia al parto y pérdidas fetales en embriones vitrificados, son debidas al genotipo y asincronía de la receptora.

Un problema primario en los procedimientos de criopreservación es la proporción de embriones intactos (masa de la célula homogénea y zona pelúcida y mucina sin daño) después de la desvitrificación. Un ejemplo aplicado sobre la reconstitución de poblaciones es el descrito por Vicente et al. (2003), quienes demuestran que el porcentaje de embriones intactos en líneas cárnicas es de alrededor del 80% (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de la comparación categórica entre la generación 7 y la 17 de la línea R.

	Embriones vitrificados (Dotaciones)	Embriones transferidos (%)	Número de Receptoras	Nº Partos (%)	Nacidos totales (%)	Nacidos vivos (%)
<b>R7</b>	194 (18)	155 (80)	16	13 (81)	55 (40)	50 (36)
<b>R17</b>	188 (22)	159 (85)	22	14 (64)	46 (43)	45 (43)
<b>Total</b>	382 (40)	314 (82)	38	27 (71)	101 (42)	95 (39)

*Nacidos totales y nacidos vivos (%): el porcentaje está calculado a partir de los embriones transferidos en hembras que paren.*

## 1. INTRODUCCIÓN

Posteriormente, los resultados obtenidos en la reconstitución de poblaciones de conejo de líneas cárnicas sitúan el rendimiento global alrededor de un 25% cuando se habla de la relación embriones vitrificados e individuos nacidos (Tabla 2. Vicente et al., 2003)

*Tabla 2. Pérdidas totales en el período de gestación y eficiencia de crioconservación de las generaciones 7 y 17 de la línea R.*

	Porcentaje de pérdidas totales (%)	Eficiencia de crioconservación (%)
<b>R7</b>	67	26
<b>R17</b>	71	24
<b>Total</b>	70	25

*Eficiencia de crioconservación (%): porcentaje de nacidos vivos sobre embriones vitrificados.*

Otro problema se presenta, al reconstituir las poblaciones con el aumento de la consanguinidad. Vicente et al. (2003) observó que con 9 machos de distinto origen es posible volver a establecer las líneas con un incremento del coeficiente de consanguinidad alrededor del 1%.

## 2. OBJETIVO

---

## 2. OBJETIVO

---

El objetivo de este trabajo es evaluar la eficiencia del programa de crioconservación para el re-establecimiento de las generaciones 18 y 36 (esta última como control) de la línea R, almacenadas en 1999 y 2014 respectivamente.

Además, se estudiará el efecto de la selección por ganancia de peso media diaria durante el engorde sobre el crecimiento fetal y postnatal.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 3.1 Animales y material biológico

Todos los procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por la Comisión de Ética en Investigación de la Universitat Politècnica de Valencia. Los animales fueron manejados de acuerdo con los principios del cuidado de los animales publicado por Real Decreto 53/2013.

Se disponía de 534 embriones vitrificados, de los cuáles 233 pertenecían a 23 donantes de la generación 18 y 301 a 26 donantes de la generación 36. El experimento contó con 45 hembras receptoras nulíparas de la línea A de la Unidad de Mejora Genética de la UPV, seleccionada por tamaño de camada al destete. De estas, 19 se destinaron a la transferencia de embriones de la generación 18 y 26 a la de la 36; ambas generaciones pertenecientes a la línea R de la Unidad de Mejora Genética de la UPV, seleccionada por velocidad de crecimiento.



*Figura 7. Ejemplar macho de la línea R de la UPV.*

### 3.2 Desvitrificación

Los embriones fueron desvitrificados mediante un baño de agua a 20°C, tras una breve exposición de las pajuelas a vapor de nitrógeno hasta observar el cambio de estado vítreo a congelado. Acto seguido, la fracción central fue vertida en una solución 0.25 M de sacarosa en medio fosfato de Dulbecco (DPBS) implementada con un 2% de albúmina sérica bovina (BSA).

### 3.3 Transferencia

Un total de 233 embriones vitrificados de la generación 18 y 301 de la 36, morfológicamente normales fueron transferidos a nivel oviductal, por laparoscopia, a 45 receptoras siguiendo el método descrito por Besenfelder y Brem (1993). La ovulación fue inducida en la receptora mediante una dosis intramuscular de 1 mg de acetato de buserelina (Suprefact, Hoechst Marion

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

---

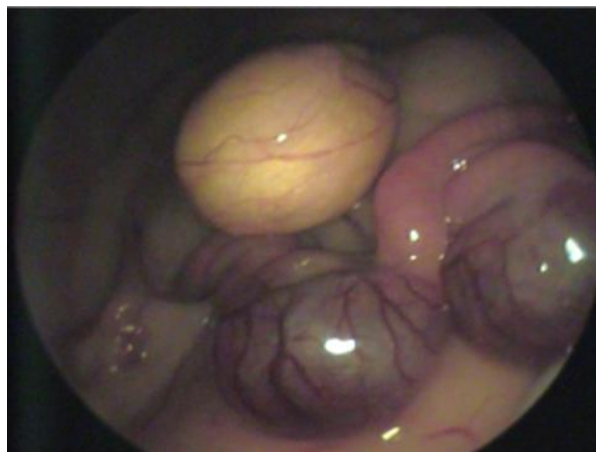
Roussel S. A, Madrid, España) 60 horas antes de la transferencia. Para la sedación durante la laparoscopia, se administró anestesia por una inyección intramuscular de 16 mg de xilazina (Bayer AG, Leverkusen, Alemania) y 5 minutos más tarde se administraron por vía intravenosa de 16 a 20 mg de clorhidrato de ketamina (Imalgène, Merial SA, Lyon, Francia).



*Figura 8. Imagen de la cánula entrando en el infundíbulo.*

#### 3.4 Implantación embrionaria

La tasa de supervivencia embrionaria fue evaluada por laparoscopia sobre la base del índice de implantación (número de embriones implantados en el día 10 sobre el total de embriones transferidos).

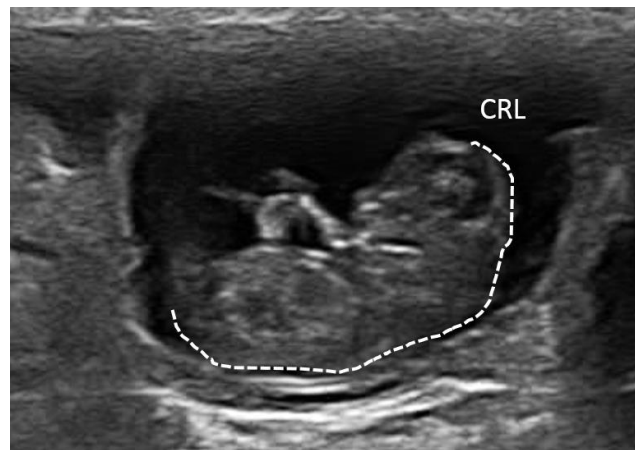


*Figura 9. Imagen de las vesículas uterinas a 10 días.*



### 3.5 Medición de la longitud de los fetos

La metodología utilizada fue similar a la descrita por Vicente et al. (2013). Las receptoras de ambos grupos experimentales fueron examinadas desde el día 12, cada 2 días, mediante ecografía con un dispositivo portátil Doppler (Esaote, España) con una sonda lineal 7,5 MHz (4-12 MHz). Antes del examen, fueron anestesiadas con 35 mg/kg de ketamina y 16 mg/kg de xylazina por vía intramuscular y el pelo del abdomen fue afeitado. Seguidamente se colocaron en una placa de poliestireno que evitó el movimiento. El examen de ultrasonido se realiza de derecha a izquierda con la sonda en orientación sagital y tras la localización de los diferentes sacos fetales, se realizan vídeos de entre 2 y 6 fetos para medir la longitud de estos mediante el software Esaote 16.



*Figura 10. Medición de la longitud de un feto.*

### 3.6 Control de partos

El día de parto se determinó el número total de gazapos nacidos, nacidos vivos y nacidos muertos. En este mismo momento, los gazapos fueron identificados con chips electrónicos, sexados y pesados individualmente.



*Figura 11. Camada de gazapos de un día.*

### 3.7 Control de ganancia de peso

A partir del momento del parto, se tomó el peso semanal de todos los gazapos individualmente hasta alcanzar la cuarta semana, determinando así la ganancia media diaria en este período.



*Figura 12. Toma del peso de un gazapo.*

### 3.8 Análisis estadístico

La eficiencia del programa de crioconservación y el resto de comparaciones categóricas entre ambas generaciones fueron analizadas mediante un test Chi-cuadrado con el programa Statgraphics.

El efecto de la selección por ganancia media diaria durante el engorde en el crecimiento prenatal fue analizado por medio de un modelo de regresión lineal con el programa de análisis estadístico R.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

---

Para el análisis de las diferencias de crecimiento postnatal hasta el destete se utilizó un Modelo Lineal General en el programa estadístico Statgraphics. Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de P fue menor de 0.05.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para llevar a cabo el estudio se utilizaron un total de 45 receptoras, de las cuales se obtuvo descendencia en 26, obteniéndose finalmente 7 orígenes vía macho de la generación 18 y 10 orígenes de la 36, garantizando el control de la consanguinidad en la población reconstituida (Vicente et al., 2003).

El tiempo de almacenamiento sí influyó en la disponibilidad de los embriones, tal como muestra la Tabla 3. De la generación 36, que llevaban menos de un año vitrificados fueron recuperados el 90%, mientras que de la 18, que habían transcurrido 15 años desde su almacenamiento sólo fueron recuperados el 69%. Estos resultados contradicen los resultados obtenidos por Vicente et al. (2003) y Lavara et al. (2011), que no encontraron diferencias significativas. No obstante, si se tienen en cuenta las dos pajuelas con dotaciones de la generación 18 que explotaron durante su desvitrificación y se descuentan, se obtendría un 82% de embriones intactos para la generación 18, demostrando así una concordancia con los resultados obtenidos en estos trabajos. Tal vez, esto puede ser debido al sistema de almacenamiento y conservación de los embriones. Cambios de presión, pequeños golpes y las recargas de nitrógeno podrían inducir criofracturas de la estructura vítrea, y estas a su vez podrían ser las responsables de la sobrepresión y por tanto de la explosión de las pajuelas durante el proceso de desvitrificación. Esto deberá ser objeto de estudio en el futuro.

*Tabla 3. Resultados de la comparación categórica entre la generación 18 y la 36 de la línea R.*

	Embriones vitrificados (Dotaciones)	Embriones transferidos (%)	Número de Receptoras	Implantados (%)	Nº Partos (%)	Nacidos totales (%)	Nacidos vivos (%)
<b>R18</b>	233 (23)	161 (69)	19	59 (37)	12 (63)	41 (40)	31 (30)
<b>R36</b>	301 (26)	272 (90)	26	114 (42)	14 (54)	69 (47)	65 (44)
<b>Total</b>	534 (49)	433 (81)	45	137 (40)	26 (58)	110 (44)	96 (38)

*Nacidos totales y nacidos vivos (%): calculado a partir de los embriones transferidos en hembras que paren.*

En cuanto a la tasa de implantación, partos e individuos nacidos, no se observan diferencias significativas entre ambas generaciones. En general, los resultados obtenidos son acordes a la bibliografía (Vicente et al. 2003).

El porcentaje de pérdidas totales durante la gestación en ambas generaciones no mostró diferencias significativas, tal como muestra la Tabla 4, lo cual se asemeja a lo visto por Vicente

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

et al. (2003). En cuanto a la eficiencia de crioconservación, sí se observó un mayor deterioro del material de la generación 18, como ya ha sido explicado anteriormente.

Tabla 4. Pérdidas en el período de gestación y eficiencia de crioconservación.

	Porcentaje de pérdidas embrionarias (%)	Porcentaje de pérdidas fetales (%)	Porcentaje de pérdidas totales (%)	Eficiencia de crioconservación (%)	
				Nacidos vivos /	Nacidos vivos /
				Vitrificados	Transferidos
<b>R18</b>	63	17	81	13	19
<b>R36</b>	58	18	76	22	24
<b>Total</b>	60	18	78	18	22

Cuando la longitud del feto de ambas generaciones fue comparada mediante ecografía, se observaron diferencias significativas, tal como se muestra en la Figura 7. Siendo, a lo largo de la gestación, superior la longitud de los fetos de la generación 36 en  $0.07 \pm 0.024$  mm ( $y_{G18} = -45.966 + 4.05 * D + 0.07 * G36$ ). Estos resultados no se pudieron comparar con los de ningún estudio previo, ya que no se sabe de la realización de ningún otro trabajo científico similar.

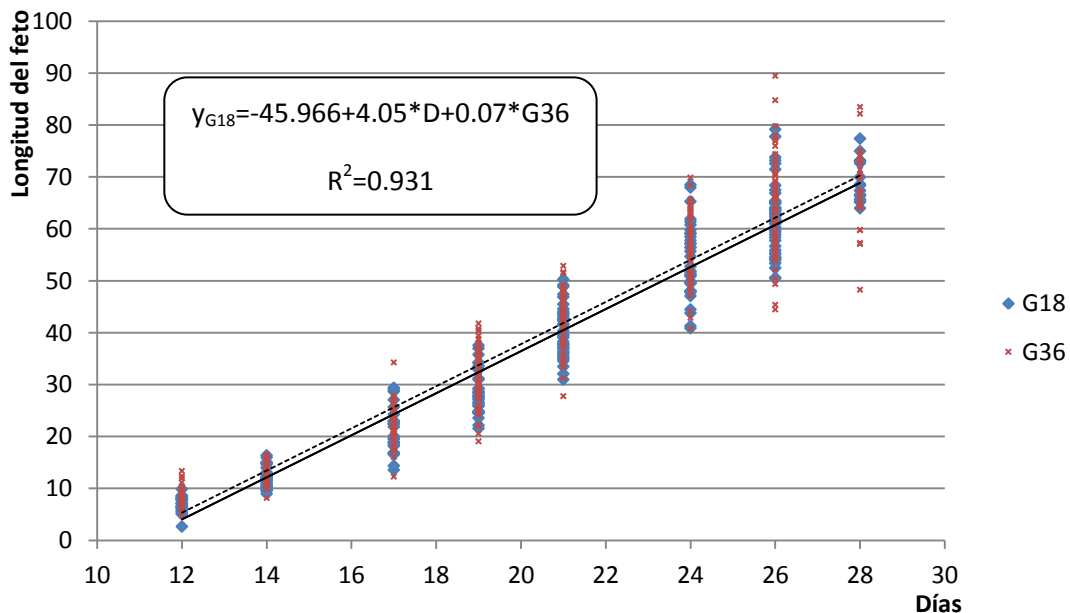


Figura 13. Comparación de crecimiento fetal entre la generación 18 y la 36.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Finalmente, cuando se comparó la ganancia media diaria durante la lactancia para ambas generaciones (18 y 36), no se observaron diferencias significativas tal y como muestra la Tabla 4. Durante el período de lactancia, los gazapos no se ven sometidos a ningún tipo de restricción alimentaria, ya que las camadas son de 8 individuos de media, cifra muy inferior a la capacidad de las hembras de la línea A.

*Tabla 5. Comparación de la ganancia media hasta el destete entre la generación 18 y la 36.*

<b>G</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>Destete</b>	<b>GT</b>
<b>18</b>	61 ± 3.9	94 ± 4.1	87 ± 5.0	181 ± 10.9	137 ± 7.2	560 ± 22.3
<b>36</b>	56 ± 3.0	98 ± 3.1	92 ± 3.8	196 ± 8.3	134 ± 5.5	575 ± 16.9

*G: generación.; S: semana de lactancia.; GT: ganancia total durante la lactancia.*

## 5. CONCLUSIÓN

---



## 5. CONCLUSIÓN

---

La metodología de vitrificación de embriones de conejo en estadio de mórula, permite la conservación y reconstitución de poblaciones seleccionadas. No obstante, hay un detrimento de la eficacia de crioconservación debido a la pérdida de material almacenado.

La selección por ganancia media diaria en el engorde en la línea R ha tenido efecto en el período de desarrollo fetal, concretamente los fetos de la generación 36 muestran una mayor longitud que los de la 18. Por el contrario, no presenta ningún efecto sobre el crecimiento durante el período de lactancia.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

- Adams, C.E. 1962. Studies on prenatal mortality in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*: The effect of transferring varying numbers of eggs. *J. Endocrin*; 24:471-90.
- Besenfelder, U. and Brem, G. 1993. Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*. 99, 53-56
- Carabaño, R. 2003. Sistemas De Producción De Conejos En Condiciones Intensivas. - XXXVII Reunión Anual da SBZ, Viçosa-MG, 24 a 27 de julio. p 18-19. Departamento de Producción Animal. Ciudad Universitaria. 28040. Madrid. España.
- COAG (Coordinadora de Organizaciones de Agricultores y Ganaderos). 2013. Anuario Agrario: Sector Cunicola (Situación del mercado). p 112-113.
- CNB-CSIC, 2015. Servicio de criopreservación de embriones de ratón. <http://www.cnb.csic.es/~criocnb/> (Consultado el 03/06/2015)
- De Blas, C. y Nicodemus, Nuria. 2001. Interacción Nutrición-Reproducción En Conejas Reproductoras *Cuniculture*. XVII Curso de Especialización Fedna : p 1.
- FAO, 2015. Estado de la cuestión en la gestión de los recursos zoogenético: Métodos de conservación. Sección F: p 485. <http://www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s20.pdf> (Consultado el 28/05/2015)
- Gómez, E.A.; Rafel, O.; Ramon, J.; Baselga, M. 1996. A genetic study of a line selected on litter size. VI World Rabbits Congress, Vol 2: 289-292.
- Gómez, E.A.; Rafel, O.; Ramon, J. 2000. Preliminary genetic analyses of Caldes line: a selection experiment for a global objective. VII World Rabbit Congress, A: 417- 423.
- González, M.; Piquer, J. 1994. Diseño de programas de alimentación para conejas. *Boletín de cunicultura*. 17(76):16.
- González, P.; Caravaca, F. 2015. Producción de conejos de aptitud cárnica. *Sistemas ganaderos en el siglo XXI*. Cap. 30. ISBN 978-84-472-0929-3. p 443-461. Departamento de producción animal. Universidad de Sevilla.
- Gregory, K. E., L. V. Cundiff, and R. M. Koch. 1991. Breed effects and heterosis in advanced generations of composite populations for preweaning traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 69:947-960.
- Hypharm, 2015. <http://www.hypharm.fr/index.php?id=53&lang=1> (Consultado el 29/05/2015)
- Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (UPV), 2015. Líneas de Investigación del equipo de Mejora Genética Animal: Mejora genética del conejo de carne y desarrollo de líneas de interés en la producción.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

- <http://www.upv.es/entidades/ICTA/info/850529normalc.html> (Consultado el 03/06/2015)
- Lavara, R.; Baselga, M.; Vicente, J.S. 2011. Does storage time in LN2 influence survival and pregnancy outcome of vitrified rabbit embryos? *Theriogenology* 76: 652-657.
  - Lebas, F. 1986. *Sistemas de producción de Conejos: Alimentación y Explotación*. Roma: FAO. p 36-38.
  - Lebas, F.; Colin, M. 1992. World rabbit production and research: situation en 1992. En *Fifth world rabbit congress*, vol A, p.29-54.
  - Lebas, F.; Coudent, P.; de Rochambeau, H.; Thebault, R. (1996). *El conejo cría y patología*. Colección FAO. Producción y sanidad animal. p 1-29. roma 225 p.
  - Marco-Jiménez, F.; Lavara, R.; Jiménez-Trigos, E.; Vicente, J.S. 2013. In vivo development of vitrified rabbit embryos: Effects of vitrification device, recipient genotype, and asynchrony. *Theriogenology* 79: 1124-1129.
  - MARM, 2015. Cunicultura.  
<http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/plataforma-de-conocimiento-para-el-medio-rural-y-pesquero/observatorio-de-tecnologias-probadas/sistemas-prodnut-animal/cunicultura.aspx#para0> (Consultado el 03/06/2015)
  - Martini Zootechnical Division, 2015  
[http://www.martinigruppo.com/zo\\_en/Conigli.php](http://www.martinigruppo.com/zo_en/Conigli.php) (Consultado el 01/06/2015)
  - Mendelsohn, R. 2003. The challenge of conserving indigenous domesticated animals. *Ecological Economics*, 45(3): 501–510.
  - Mínguez, C. (2014). *Análisis Genético de Caracteres de Crecimiento, Matadero y Calidad de Carne en Líneas Maternales de Conejo y en su Cruzamiento Dialélico*. Departamento de Producción Animal, Universidad Politécnica de Valencia. p 33-35.
  - Mínguez, C., Gutiérrez-Valcárcel, A., Sánchez, J. P., EL Nagar A.G., Ragab, M., Baselga, M. 2011. Comparación de características de sacrificio en conejos cruzados procedentes de cuatro líneas maternales. *AIDA* (2): 30-32
  - Porter, W. L. 1993. *Pigs: A handbook to the breeds of the world*. Cornell University, Ithaca, New York.
  - Secal, 2014. *Sociedad Española Para las Ciencias Del Animal De Laboratorio*. Capítulo 2: Biología y manejo reproductivo del ratón. p: 75-81.  
<http://secal.es/web/wp-content/uploads/2014/10/02-GENETICA-Pba-2.pdf>  
(Consultado el 03/06/2015)

- Tisdell, C. 2003. Socioeconomic causes of loss of animal genetic diversity: analysis and assessment. *Ecological Economics*, 45(3): 373.
- Rhoad, A. O. 1949. The Santa Gertrudis breed. The genesis and the genetics of a new breed of beef cattle. *J. Heredity*. 40: 115-126.
- Vicente, J.S.; García-Ximénez, F. 1996. Direct transfer of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 45: 811-815.
- Vicente, J.S.; Saenz-de-Juano, M.D.; Jiménez-Trigos, E.; Viudes-de-Castro, M.P.; Peñaranda, D.S.; Marco-Jiménez, F. 2013. Rabbit morula vitrification reduces early foetal growth and increases losses throughout gestation. *Cryobiology* 67: 321–326.
- Vicente, J.S.; Viudes-de-Castro, M.P.; García, M.L.; Baselga, M. 2003. Effect of rabbit line on a program of cryopreserved embryos by vitrification. *Reprod.Nutr.Dev.*43: 137–143.
- Youssef, Y. K., M. M. Iraqi, A. M. El-Raffa, E. A. Afifi, M. H. Khalil, M. L. García, and M. Baselga. 2008. A joint project to synthesize new lines of rabbits in Egypt and Saudi Arabia: emphasis for results and prospects. In: *Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy*. p. 1637-1642.