

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

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



**RESPUESTA DIFERENCIAL DE DOS ESTIRPES
GENÉTICAS DE CONEJO A LA ESTIMULACIÓN
DEL DESARROLLO FOLICULAR CON
CORIOFOLITROPINA ALFA.**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: MARIA SALVALEDA MATEU

TUTOR/A: JOSÉ SALVADOR VICENTE ANTÓN

Curso Académico: 2019/2020

VALÈNCIA, JULIO 2020



Título de TFG: Respuesta diferencial de dos estirpes genéticas de conejo a la estimulación del desarrollo folicular con coriofolitropina alfa.

Alumna: Dña. Maria Salvalada Mateu.

Tutor Académico: Prof. D. José Salvador Vicente Antón

Valencia, Julio 2020

RESUMEN

La tecnología reproductiva ha permitido solventar diferentes problemas de infertilidad humana mientras en otros mamíferos ha facilitado la conservación, manipulación, producción y difusión de genotipos de interés tanto en producción animal como en modelos animales para enfermedades, bio-reactores o farmacológicos. Siendo la superovulación una de las principales tecnologías, se utiliza con la intención de obtener un mayor número de embriones y óvulos. En el conejo, como en otros mamíferos de interés, es habitual aplicar productos de estimulación como la eCG, hCG, hMG, FSH de origen hipofisario y recientemente FSH recombinantes como la Coriofolitropina alfa (rhFSH-CTP), que corresponde a una FSH recombinante de larga duración. A pesar de las ventajas de esta hormona, al igual que el resto de tratamientos de superovulación, su respuesta ovulatoria no es uniforme, sino que hay ciertos parámetros como la edad, la nutrición y el sobrepeso, el ambiente o el genotipo que pueden hacer que varíe entre diferentes individuos.

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de la rhFSH-CTP+hCG para obtener embriones sobre dos líneas genéticas de conejo con características diferenciales en términos de parámetros de crecimiento y reproductivos. La primera de ellas fue seleccionada por crecimiento y tiene problemas reproductivos, mientras que la segunda se escogió por su prolificidad y muestra unos excelentes índices reproductivos. Conejas nulíparas de ambas líneas fueron tratadas con 3ug de rhFSH-CTP suplementado con 7,5 IU de hCG. Fue estudiada su respuesta en términos de tasa de ovulación, eficiencia, número y calidad de los embriones recuperados y fue evaluado el efecto del tratamiento sobre la viabilidad postransferencia de los embriones obtenidos frente a embriones de conejas controles no tratadas en ambas líneas.

Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento rhFSH-CTP+hCG incrementa tanto la tasa de ovulación, hasta 57,8 frente 11,5 control, como el número de embriones normales recuperados por hembra (37,1 vs 9,3 Control). No obstante, se observaron diferencias significativas entre las líneas para el número, la eficiencia total y el porcentaje de normalidad de los embriones recuperados, pudiendo establecer una relación negativa de la rhFSH-CTP con el genotipo de la línea R. Además, pudo comprobarse que los embriones seleccionados conforme al criterio de calidad morfológico presentaban la misma viabilidad postransferencia con independencia del tratamiento y de la línea genética. En general el 74,7% de los embriones transferidos implantaron y el 62,2% llegaron a nacer. En conclusión, el tratamiento de superovulación con coriofolitropina alfa permitió incrementar por 4 el número de embriones catalogados como normales o de excelente calidad atendiendo a criterios morfológicos. Estos embriones, una vez transferidos, alcanzaron porcentajes de viabilidad al parto similar a los embriones de conejas no superovuladas. No obstante, la línea genética de origen de los embriones si tuvo efecto sobre el porcentaje de embriones con excelente calidad morfológica, mostrando que el genotipo de la línea R interacciona negativamente con el tratamiento de superovulación.

PALABRAS CLAVE

Coriofolitropina alfa; Superovulación; Calidad embrionaria; Estirpe genética; Conejo.

Title: Response of two rabbit genetic lines to the stimulation of follicular development with Corifollitropin alfa.

ABSTRACT

Reproductive technology has solved different human infertility problems whereas in other mammals has facilitated genotype interest conservation, manipulation, production and diffusion in animal production and animal model for illnesses, bio-reactors, pharmacological model. Superovulation is known as one of the main reproductive technologies and it is used for obtaining a higher number of embryos and oocytes. Applying stimulation products to rabbits, or other mammals of interest, like eCG, hCG, hMG, or pituitary FSH is a common practice. Recently, recombinant FSH with a larger duration of action named Coriofolitropina alfa (rhFSH-CTP) is being commercialised. Despite the advantages of this hormone, like the rest of superovulation treatments, the response is not uniform. It depends on other parameters like age, nutrition and overweight, environment, or genotype that can induce different responses among individuals

This study aimed to evaluate the efficiency of rhFSH-CTP to obtain embryos on two genetic lines with different characteristics in terms of growth and reproductive parameters. The first one was selected because of its fast growth rate and has reproductive problems, whereas the second one was chosen due to its prolificity and shows excellent reproductive indices. Nulliparous rabbits of both lines were treated with 3ug of rhFSH-CTP supplemented with 7,5IU of hCG. It was studied its responsiveness to the treatment based on ovulation rate, efficiency, number and quality of recovered embryos, and evaluated the effect of the treatment on recovered embryo posttransference viability versus untreated control rabbit embryos from both lines.

The results showed that the treatment with rhFSH-CTP increases ovulation rate, from 11.5 control to 57.8, and the number of normal embryos recovered by female (37,1 vs 9,3 control). Nevertheless, significant differences were observed between the lines for the normal embryo number, efficiency, and percentage. Therefore, establishing a negative relation of rhFSH-CTP with R line genotype. Furthermore, the selected embryos according to the morphological quality criteria showed the same viability independently of the genetic line or the treatment received. Generally, 74.7% of the transferred embryo were able to implant successfully and 62.2% were born. In conclusion, superovulation treatment with corifolitropina alfa increased four times the number of embryos catalogued as normal or of excellent quality according to the morphological criteria. Once transferred, these embryos showed similar viability percentages compared with control embryos. However, the genetic line of the embryo affected the excellent morphological quality embryo percentage, showing that the genotype of the R line interacts negatively with the superovulation treatment.

KEYWORDS

Coriofolitropin alfa; Superovulation; Embryo quality; Genetic lines; Rabbit.

Títol de TFG: Resposta de dues línies genètiques de conill a l'estimulació de el desenvolupament fol·licular amb Coriolfotropina alfa.

RESUM

La tecnologia reproductiva ha permès solucionar diferents problemes d'infertilitat humana mentres que en altre mamífers ha facilitat la conservació, manipulació, producció y difusió de genotips d'interés tant en producció animal com en models animals per a malalties, bio-reactors o farmacològics. Sent la superovulació una de les principals tecnologies s'utilitza amb la intenció d'obtindre un major nombre d'embrions i òvuls. En el conill, com en altres mamífers d'interés, es habitual aplicar productes d'estimulació com la eCG, hCG, hMG, FSH de origen hipofisiari i recentment, FSH recombinants com la Coriolfotropina alfa (rhFSH-CTP), que correspon a una FSH recombinant de llarga duració. Encara que aquesta presente molts avantatges, al igual que la resta de tractaments de superovulació, la resposta ovulatòria no es uniforme, sinó que hi ha certs paràmetres com l'edat, la nutrició i sobrepès, l'ambient, o el genotip que poden fer que varie entre diferents individus.

L'objectiu d'aquest experiment va ser avaluar l'eficiència de la rhFSH-CTP per obtindre embrions sobre dos línies genètiques de conill amb característiques diferencials en terminis de paràmetres de creixement i reproductius. La primera línia ha sigut seleccionada per el seu ràpid creixement i té problemes reproductius, mentre que, la segona ha sigut escollida per la seua prolificitat i mostra uns excel·lents índexs reproductius. Conilles nul·líparas d'ambdues línies van ser tractades amb 3ug de rhFSH-CTP suplementat amb 7,5 UI de hCG. La resposta va ser estudiada en terminis de taxa d'ovulació, eficiència, nombre y qualitat dels embrions recuperats i es va avaluar l'efecte del tractament sobre la viabilitat postransferencia dels embrions obtinguts front a embrions de conilles control no tractades d'ambdues línies.

Els resultat sugereixen que el tractament rhFSH-CTP incrementa tant la taxa d'ovulació, fins 57,8 front a 11,5 control, com el nombre d'embrions normal recuperats per femella (37,1 vs 9,3 control). No obstant, s'observen diferències significatives entre les línies per al nombre, l'eficiència total i el percentatge de normalitat dels embrions recuperats, i per tant, establint-se una relació negativa de la rhFSH-CTP amb el genotip de la línia R. A més, els embrions seleccionats d'acord amb el criteri de qualitat morfològica presentava la mateixa viabilitat postransferencial independentment de la línia genètica o tractament. En general 74.7% dels embrions transferits implantaren i el 62,2% arribaren a nàixer. En conclusió, el tractament de superovulació amb coriolfotropina alfa va permetre incrementar per 4 el nombre d'embrions catalogats com normal o d'excel·lent qualitat morfològica. Aquests embrions, una vegada transferits arribaren a percentatges de viabilitat al part semblants als dels embrions de conilles no superovulades. No obstant, la línia genètica dels embrions si va tindre efecte sobre el percentatge d'embrions amb excel·lent qualitat morfològica, mostrant que el genotip de la línia R, interacciona negativament amb el tractament de superovulació.

PARAULES CLAU

Coriolfotropina alfa; Superovulació; Qualitat embrionària; Línies genètiques; Conill.

AGRADECIMIENTOS

Després de 4 anys estudiant biotecnologia casi no em puc creure que arribe el moment d'acabar (i més en mitat d'una pandèmia) i toca donar les gràcies a moltes persones que d'alguna manera o altra han contribuït a que arribe aquest moment.

Primerament, moltíssimes gràcies al meu tutor, José, per donar-me la oportunitat de fer l'últim treball de tota la carrera al seu laboratori. Moltes gràcies per la teua paciència infinita, per respondre'm a tot amb un somriure, per la calma que transmetes, perquè es nota que vols ensenyar, pels teus ànims i consells. Eres un magnífic tutor, professor i persona.

També m'agradaria donar les gràcies a la meua família. A ma mare per deixar-me triar sempre el que volia estudiar, aguantar els meus plors i frustracions de la carrera i en general, per tornar-me sempre un somriure i, sobretot, per estar. A la meua germana per creure en mi més del que jo mai he pogut, per els consells i ànims sempre que han fet falta i quan no. I a mon pare per sempre deixar-me estudiar i aprendre el que jo volia.

Gràcies a David, per oferir-me sempre la seua ajuda i consells, per intentar animar-me els 4 anys de carrera i fer-me riure sempre.

Agrair als meus amics de classe totes les rialles en els moments més catastròfics de la carrera. Totes les explicacions per nota de veu de WhatsApp la nit abans del examen. Les risses en el laboratori. Les frustracions compartides per tots els treballs. Els nervis d'abans d'un examen i la quedada de després d'ells. Les quedades per jugar a la Fallera Calavera. Els viatges a Budapest, Malta, Estocolm, Londres i els que queden. En general, moltíssimes gràcies per tots el moments, els de classe i fora.

Per acabar, moltes gràcies a qualsevol persona que tinguera una bona paraula o un bon consell.

Moltíssimes gràcies a tots!

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Desarrollo de tecnologías reproductiva y modelos animales | 1 |
| 1.2. Métodos de estimulación del desarrollo folicular | 2 |
| 1.2.1 Desarrollo folicular. Fases y regulación | 2 |
| 1.2.2. Tipos de gonadotropinas y modo de utilización..... | 3 |
| 1.3. Efectos de los tratamientos de superovulación sobre la calidad ovocitaria y embrionaria | 6 |
| 1.4. Factores que influyen la respuesta a los tratamientos. | 8 |
| 1.4.1. Edad. | 8 |
| 1.4.2. Nutrición y sobrepeso..... | 9 |
| 1.4.3. Ambiental..... | 10 |
| 1.4.4. Genotipo | 10 |
| 2. OBJETIVO | 12 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 13 |
| 3.1. Diseño experimental | 13 |
| 3.2. Animales y alojamientos | 13 |
| 3.3. Tratamiento de superovulación e inseminación. | 14 |
| 3.4. Obtención y catalogación de embriones | 14 |
| 3.5. Transferencia de embriones | 15 |
| 3.6. Laparoscopia para determinar la tasa de implantación. | 16 |
| 3.7. Análisis estadístico | 16 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 17 |
| 4.1. Efecto de la estimulación ovárica con coriofolitropina alfa y hCG (rhFSH-CTP+hCG) y de línea genética sobre respuesta de las conejas donantes de embriones | 17 |
| 4.1.1 Efectos sobre la inducción a la ovulación (IO)..... | 17 |
| 4.1.2 Efecto sobre la tasa de ovulación (TO). | 19 |
| 4.1.3. Efecto la eficiencia de recuperación total (ERT)..... | 20 |
| 4.1.4. Efecto sobre la obtención de embriones clasificados como normales atendiendo a criterios de morfología y cronología. | 21 |
| 4.2 Efecto de la estimulación ovárica con coriofolitropina alfa (rhFSH-CTP) y de línea genética sobre la viabilidad in vivo de los embriones catalogados como normales | 24 |
| 5. CONCLUSIONES | 28 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 29 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1. | Esquema eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HPO) en la coneja..... | 3 |
| Figura 2. | Diseño experimental..... | 13 |
| Figura 3. | Ovarios de conejas utilizadas en este experimento. A. Ovario de hembra no tratada. B. Ovarios de hembras tratadas..... | 15 |
| Figura 4. | Embriones vista 100X..... | 16 |
| Figura 5. | Efecto del tratamiento sobre la inducción a la ovulación..... | 17 |
| Figura 6. | Efecto del tratamiento sobre la tasa de ovulación..... | 19 |
| Figura 7. | Porcentaje de eficiencia total..... | 20 |
| Figura 8. | Porcentaje eficiencia total acorde con el tratamiento..... | 20 |
| Figura 9. | Índice de normalidad, porcentaje de embriones normales respecto al total de embriones..... | 22 |
| Figura 10. | Número de embriones recuperados morfológicamente normales acorde con la línea..... | 23 |
| Figura 11. | Número de embriones recuperados morfológicamente normales acorde con el tratamiento..... | 23 |
| Figura 12. | Número de embriones recuperados morfológicamente normales por tratamiento y línea..... | 23 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabla 1. | Inducción a la ovulación, tasa de ovulación, eficiencia de recuperación total, índice de normalidad y número de embriones morfológicamente normales atendiendo a criterios morfológicos y de cronología..... | 18 |
| Tabla 2. | Número de conejas, embriones transferidos, implantados y nacidos, pérdidas fetales y pérdidas perinatales por grupo experimental..... | 25 |

ABREVIATURAS

AMH RII: receptor de la hormona AMH RII

AMH: hormona anti mülleriana

ATP: adenosina trifosfato

BOHB: beta-hidroxibutirato

BPBS: Dulbecco's phosphate buffer saline (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco)

BSA: Bovine Serum Albumin (Albúmina de suero bovino)

CHO: ovario de hámster chino (chinese hámster ovary)

CTP: extremos péptido carboxilo terminal (carboxy-terminal perptide)

eCG: gonadotropina coriónica equina

eFSH: gonadotropina hipofisaria de origen equino

ERQ1: número de embriones normales recuperados por coneja

ERT: eficiencia de recuperación

ETR: embriones transferidos por coneja

FIV: fecundación in vitro

FSH: hormona estimulante folicular

g: gramos

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina

hCG: hormona coriónica humana

hGM: gonadotropina menopáusica humana

HPO: hipotálamo-pituitaria-ovario

IA: inseminación artificial

IATF: inseminación artificial en tiempo fijo

ICSI: microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (intracytoplasmic sperm injection)

IGF: factor de crecimiento insulínico (insulin growth factor)

IGF-I: factor de crecimiento insulínico tipo 1

IGF-II: factor de crecimiento insulínico tipo 2

IGF-IIR: receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 2

IMP: número de embriones implantados

IN: índice de normalidad

IO: inducción a la ovulación

IU: unidad internacional

LH: hormona luteinizante

línea A: línea amarilla

línea R: línea rosa

M: molar

ml: mililitros

mM: milimolar

MOET: Multiovlación y transferencia de embriones

mRNA: RNA mensajero

NETA: ácidos grasos no esterificados

NT: número de gazapos nacidos por coneja

°C: grados centígrados

oFSH: gonadotropina hipofisaria de origen ovino

OHSS: Síndrome de hiperestimulación ovárico

PF: pérdidas fetales

pFSH: gonadotropina hipofisaria de origen porcino

PICSI: Selección de espermatozoides en la Fecundación In Vitro (Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection)

PMSG: gonadotropina sérica de yegua gestante

PP: pérdidas perinatales

rFSH: hormona folículo-estimulante recombinante

rhFSH: hormona folículo-estimulante recombinante humana

rhFSH-CTP: Hormona corifolitropina-alfa

rhFSH-CTP+hCG: Hormona corifolitropina-alfa suplementada con hCG

rhLF: hormona luteinizante recombinante humana

rLH: hormona luteinizante recombinante

SNPs: polimorfismo de nucleótido simple

T.O: tasa de ovulación

uFSH: hormona folículo-estimulante humana urinaria

ug: microgramo

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Desarrollo de tecnologías reproductiva y modelos animales

En el ámbito reproductivo, la biotecnología ha permitido solventar diferentes problemas de infertilidad humana mientras que en otros mamíferos ha facilitado la conservación, manipulación, producción y difusión de genotipos de interés tanto en producción animal como de modelos animales para enfermedades, bio-reactores o farmacológicos (Palma, 2008). Entre las tecnologías desarrolladas en el ámbito reproductivo es posible destacar el control de la estimulación ovárica, la maduración de folículos y óvulos, la microinseminación in vitro (FIV, ICSI, PICSI...), el cultivo de embriones o la criopreservación de gametos y embriones, entre otras (Carballo et al., 2019).

La técnica de estimulación ovárica tiene como objetivo el aumento el número de embriones transferibles (Viudes-De-Castro et al., 2009) vía el uso de hormonas exógenas que estimulan el ovario e incrementan el número de folículos reclutados por ciclo. Este hecho, introdujo la necesidad de separar temporalmente la obtención de gametos y embriones de su uso, impulsando el desarrollo de nuevas técnicas como la criopreservación (Bosch et al., 2020). Estos tratamientos conjuntamente con la inseminación artificial (IA) y la microinseminación se han llevado a cabo tanto en clínicas de reproducción humana para mejorar la fertilidad en la especie humana, que viene decayendo un 15% en los últimos años (Ortega, 2011), como en animales con la intención de agilizar la difusión y conservación de recursos genéticos animales irremplazables (Roldán y Garde, 2004; Marco y Vicente, 2012).

En el desarrollo de las tecnologías reproductivas se utilizan diferentes modelos animales, como la rata, el ratón, el conejo, diferentes especies de monos, etc... (Amann, 1982).

El conejo es un animal que no solo es interesante en biomedicina sino también como animal de granja por su producción de carne y piel (Redondo y Rodríguez, 2007). En el ámbito de la biomedicina el conejo ha resultado un buen modelo animal y es utilizado en diferentes campos como la producción de anticuerpos policlonales contra agentes infecciosos (Alarcón et al., 2000; García et al., 2005, Londoño et al., 2011). También, se utiliza para el estudio del trastorno genético hipercolesterolemia familiar. Este provoca un nivel de colesterol alto en la sangre que puede derivar en aterosclerosis, una enfermedad en la que se acumula la grasa en las arterias (Alfonso et al., 2001; Porrás et al., 2003). Otro ejemplo como modelo animal es su uso en cirugía láser (Luciano et al., 1989; Alves et al., 2016), entre otras aplicaciones.

Además, este animal resulta ser un buen modelo para los estudios de desarrollo embrionario por su similitud en la cronología embrionaria temprana con la especie humana permitiendo estudiar alteraciones en las primeras fases de la embriogénesis, así como estadios concretos como la gastrulación o implantación (Fischer et al, 2012), y por su corto periodo de gestación de alrededor de 31 días (First y Bosc, 1979; Monari, 1987). Además, al ser una especie de ovulación inducida es posible establecer el tiempo de gestación de forma más exacta que en otras especies (Schencke et al, 2004). Otro punto a favor es la extensa investigación en esta especie de técnicas imprescindibles para la reproducción asistida como sería el cultivo embrionario in vitro (Kane y Foote, 1970) o la crioconservación de semen y embriones (Rall, 1993; Naik et al., 2005; Mocé y Vicente, 2009).

El conejo como animal productivo es criado en algunos países asiáticos como China, europeos como Italia, Francia, España o Hungría y africanos como Egipto o Algeria (Lebas et al., 1996; Redondo y Rodríguez, 2007) en los que tradicionalmente se consume y es utilizado como una fuente de proteína de alto valor nutricional. En 2018 España produjo 53 toneladas de carne de conejo (STATISTA RESEARCH DEPARTMENT, 2020). Su elevada tasa de reproducción, su alimentación herbívora y rendimiento y calidad de su carne son claras ventajas en este mercado (Lebas et al., 1996).

En ambos ámbitos, tanto sanitario como ganadería, el conejo es un modelo bien establecido en lo que se refiere a obtención de esperma y embriones, criopreservación y otras técnicas para mejorar su reproducción y establecer líneas genéticas de conveniencia.

1.2. Métodos de estimulación del desarrollo folicular.

1.2.1 Desarrollo folicular. Fases y regulación

Previamente a cualquier estimulación folicular es necesario conocer el mecanismo intrínseco o propio de desarrollo y regulación del folículo. Así la coneja muestra algunas peculiaridades que es necesario reseñar: muchas especies como la vaca (Leibfried-Rutledge, 1999), la oveja (Sawyer et al., 2002) o la humana (Baker, 1963) desarrollan los folículos primordiales en un estado prenatal. No obstante, este proceso transcurre aproximadamente a los 10 días de vida en el conejo (Peters et al., 1965; Van den Hurk et al., 1997; Hutt et al., 2006).

A diferencia de las especies citadas, la coneja no ovula solo como consecuencia del desarrollo folicular tras alcanzar, sino que además ha de ser estimulada, y es el coito el que induce a la ovulación como ocurre en camélidos (Sumar, 1993; Rodríguez, 2004)

La coneja, además, es capaz de volver a quedar gestante inmediatamente después del parto (Castellini, 1996), permitiendo eficientemente la ovulación, el transporte de los gametos (capacitación) y la fecundación.

La regulación folicular viene dada por una comunicación entre en el sistema nervioso central y la gónada, más concretamente, por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (HPO) (Figura 1). Con este eje se produce una administración o bloqueo de hormonas que ayudan al desarrollo y la selección de los folículos. Las hormonas directamente implicadas en estos procesos son la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), la hormona estimulante folicular (FSH), involucrada en el crecimiento folicular, y la hormona luteinizante (LH) que induce a la maduración final y la ovulación de los folículos preovulatorios (Arias et al., 2007). En la coneja, como en otros mamíferos, la GnRH es secretada por el hipotálamo provocando la liberación de FSH y LH con la finalidad de promover el desarrollo y maduración de los folículos de la fase folicular del ciclo que culminará con la descarga ovulante de LH, la ovulación y la formación de los cuerpos lúteos durante la fase luteal (Channing et al., 1978; Arias et al., 2007). En esta especie, a raíz del estímulo de la monta se produce una descarga de LH y en menor medida de FSH desde la hipófisis (Bakker y Baum, 2000). La actividad gonadotrópica se verá afectada por las secreciones de otras neuronas a nivel hipotalámico (AgRP, GABA, PMOC, Kisseptinas,...) y células del tejido adiposo o adrenal que responden a factores como la nutrición o factores ambientales como el estrés (Tena-Semper, 2009; Catalano et al., 2009; Sam y Dhillon, 2010; Roa et al., 2012; Acevedo-Rodríguez et al., 2018)

Durante el proceso de desarrollo de los folículos, estos cambian su actividad y morfología pasando por 5 estadios divididos en dos grupos: folículos preantrales (primordiales, primarios y secundarios) y antrales (terciarios y preovulatorios) (Arias et al., 2007)

Los folículos primordiales se caracterizan por la presencia de un ovocito rodeado por células de la granulosa que presentan unas uniones tipo gap (Kennedy et al., 2003).

El folículo primario presenta las células de la granulosa que rodean el ovocito en disposición cúbica en vez de plana, a diferencia del anterior. El folículo secundario se caracteriza por tener dos o más capas de células de la granulosa debido a su proliferación y, además, empieza a aparecer células de la teca (Arias et al., 2007).

Con la aparición de una cavidad llamada antro folicular, el folículo se pasa a denominar folículo antral. Las células de la granulosa disponen de receptores para la FSH y se observa una creciente actividad endocrina, paracrina y autocrina de 17- β -estradiol, IGF-1 y inhina entre otros

(Velázquez y Mendieta, 2005). Por la gran capacidad proliferativa de las células de la granulosa el folículo ya está rodeados por de 6 a 9 capas de estas células (Alvariño, 1993).

Finalmente se encuentra el folículo de Graff o preovulatorio caracterizado por el tamaño del antro y por la adquisición de las células de la granulosa de receptores para la LH (Nicosia et al., 1975; Phoophitphong et al., 2017)

Además, se establecen dos fases durante el desarrollo. La primera corresponde a la fase folicular no gonadotropo receptiva. Esta incluye los primeros estadios del folículo, por lo que los folículos preantrales son independientes de las gonadotropinas FSH y LH liberadas por la GnRH para su desarrollo. La segunda fase corresponde a la fase folicular gonadotropo receptiva. En esta fase las hormonas FSH y LH son indispensable para el crecimiento de los folículos y engloba a los folículos antrales (Arias et al, 2007).

La producción de los precursores de los estrógenos viene dada por la unión entre los receptores de las células de la teca y la LH. De la misma forma, las células de la granulosa presentan receptores para la FSH, que además poseen actividad aromatasa sintetizando 17-β estradiol (Erickson y Ryan, 1975 y 1976). Conforme aumenta de tamaño el folículo también lo hacen los niveles de 17-β estradiol (Lefèvre y Caillol, 1978). Esto es importante para el reclutamiento y selección de los folículos, para que los dominantes puedan continuar creciendo y el resto (folículos alrededor de 700 μm) proceda a la atresia. Los niveles altos de 17-β estradiol, junto con la inhibina, ejercen un feed-back negativo sobre la hipófisis (Christian y Moenter, 2010; De Turckheim et al., 1983) de tal manera que esta descende progresivamente los niveles de FSH (Souza et al., 1996). Así pues, los folículos dominantes (con un diámetro mayor) son los que inhiben el crecimiento de los folículos antrales que presentan un diámetro menor (aproximadamente 700 μm) debido a la liberación de estrógenos de estos primeros. La LH sigue siendo necesaria para continuar el crecimiento de los folículos y, por tanto, es la predominante en esta fase (Arias et al., 2007). Cuando los niveles de estradiol están al máximo, la retroalimentación negativa cambia a positiva y actúa sobre el hipotálamo liberando GnRH que causa la liberación del pico de LH y se produce finalmente la ovulación (Christian y Moenter, 2010)

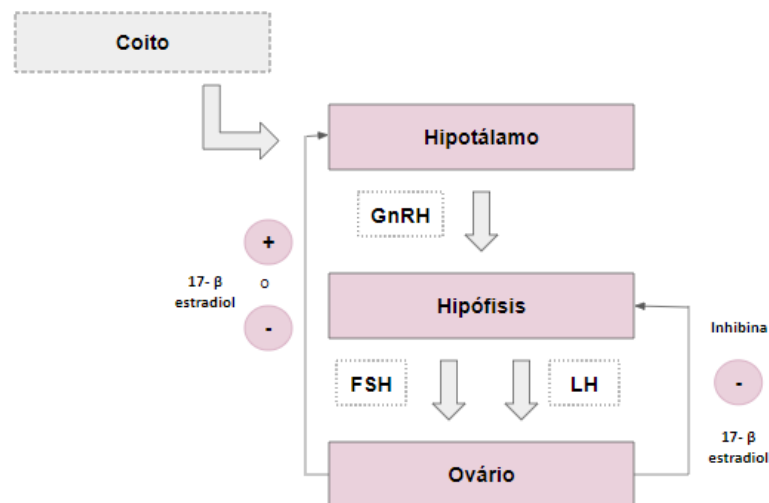


Figura 1. Esquema eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HPO) en la coneja.

1.2.2. Tipos de gonadotropinas y modo de utilización.

La reproducción en animales domésticos se ha intentado mejorar con diferentes mecanismos como programas de genética animal y otros recursos como sería el uso de gonadotropinas exógenas para la estimulación ovárica.

A partir de los conocimientos de la función folicular, los tratamientos fueron dirigidos al uso de hormonas como la FSH y LH.

La FSH se puede conseguir a partir de la purificación de la FSH proveniente de diferentes extractos pituitarios de la glándula pituitaria o la orina (uFSH) por técnicas como la cromatografía (Camero et al., 1993). Puede obtenerse FSH de diferentes animales como el porcino (pFSH), equino (eFSH) u ovino (oFSH). Esta hormona estimula el reclutamiento y crecimiento de folículos antrales uniéndose a los receptores encontrados en las células de la granulosa (Hsueh et al., 1984). La FSH también estimula el crecimiento de estas células al igual que su proliferación (Vegetti y Alagna, 2006). Su administración se realiza por vía intravenosa o subcutánea (Sánchez y Silvia, 2003).

En cuanto a la LH se puede obtener por las mismas vías (Camero et al., 1993). Esta hormona se puede incorporar a diferentes tratamientos en compañía de la FSH (Raju et al., 2013) o conjuntamente con la hormona coriónica equina (eCG) (Muñoz et al., 2012). Su función es proporcionar andrógenos como sustrato para la aromatización y produce un efecto directo sobre la estimulación y modulación de la foliculogénesis (Viudes-De-Castro et al., 2015). Además, el efecto de la LH podría inducir la ovulación (Escudero, 2012).

Su administración suele ser idéntica a la de la FSH, aunque su dosis óptima asociada al tratamiento de superovulación aún no ha sido establecida. Cabe reseñar tanto que las preparaciones comerciales de gonadotropinas de origen hipofisario presentan ratios variables de FSH/LH y, por lo tanto, se podrían obtener diferentes respuestas en los tratamientos (Murphy et al., 1984) como que estos extractos podrían estar contaminados por otras hormonas o, al ser de origen animal, a portar partículas virales no testadas del animal del que proviene (Hesser et al., 2011).

Además, la FSH tiene una vida muy corta y por tanto la inyección se produce un pico de FSH que luego baja hasta la próxima inyección. Para evitar que los niveles de FSH estén por debajo del umbral se acostumbra a tomar una dosis diaria (Leão y Esteves, 2014), lo que puede resultar bastante engorroso para el manejo del paciente y puede llevar a errores.

La variedad en los diferentes lotes y los problemas de las fuentes de hormonas, así como su corto periodo de uso se solucionaron con la aparición de las hormonas recombinantes: rLH y rFSH (Viudes-de-Castro et al., 2009 y 2015). La rFSH se obtiene de la transfección de genes que codifican las subunidades α y β de la FSH a una línea de células derivadas de ovario de hámster chino (CHO), cuyas características eran similares a la uFSH y, por lo tanto, también se debía administrar diariamente (Duijkers et al., 2002). Para alargar la vida media de la FSH se introdujo la hormona corifollitropin alfa (rFSH-CTP), utilizando técnicas de transferencia genética y mutagénesis de sitio dirigido. La molécula resultante se trata de una FSH recombinante que conserva la subunidad α , mientras que la subunidad β es una hibridación entre esta misma subunidad de la FSH y el péptido carboxilo terminal (CTP) de la subunidad β de la hormona coriónica humana (hCG) (Fares et al., 1992). Esta FSH recombinante de larga duración (aproximadamente presenta una vida media dos veces más larga que la FSH) permite reducir el número de inyecciones, simplificar los protocolos y reducir el manejo del paciente (Duijkers et al., 2002).

Existen otras hormonas que también se pueden utilizar para los protocolos de estimulación ovárica como la hormona coriónica equina (eCG). Esta hormona pertenece a la familia de hormonas glicoproteicas, como la LH y la FSH. Se produce en las copas endometriales de la yegua, de hecho, también se puede denominar como gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG, siglas en inglés) (De Rensis et al., 2014). Por su gran afinidad a los receptores de LH y FSH actúa como estas hormonas en especies que no son equinas (Stewart y Allen, 1981). Su actividad gonadotrópica es más parecida a la FSH por lo que es capaz de aumentar el tamaño de los folículos. No obstante, tiene suficiente actividad LH como para poder inducir a la ovulación

y la luteinización. Además, su vida media está considerada como larga (<24h) (Riviere y Papich, 2018).

La eGC fue utilizada en varios programas MOET (multiovlación y transferencia de embriones) con la intención de un incremento en la respuesta ovulatoria, requiriéndose en torno a 2500 IU en una sola administración (Bourke et al., 1995; De Rensis et al., 2014), aunque está siendo sustituido por los nuevos productos de FSH. Actualmente, su uso está asociado a los programas de inseminación artificial en tiempo fijo (IATF) con la finalidad de mejorar la sincronización del celo y la fertilidad (Souza et al., 2009; Sá Filho et al., 2010; De Rensis, 2014).

En la orina de las mujeres en estado encontramos la hCG y es sintetizada por las células del sincitiotrofoblasto de la placenta. Se trata de una glicoproteína no pituitaria que también presenta una larga vida media (<24h) (Riviere y Papich, 2018). Aunque es cierto que tienen una actividad similar a la LH (Le Cottonnec, et al.,1998), se diferencian en cuanto a potencial y duración de acción (Rao et al.,1979; Ezcurra y Humaidan, 2014). Por su larga duración la hCG aparentemente resulta un mejor candidato ya que reduce el número de dosis y por tanto de manipulación y simplifica el tratamiento. Por ello esta hormona podría emplearse para la inducción a la maduración de los folículos que tuvieran un tamaño adecuados en los programas de estimulación (Loy y Hughes, 1996).

Hay diferentes tratamientos que pueden utilizar eCG para el crecimiento del folículo y la hCG para inducir a la ovulación (Riviere y Papich, 2018).

Finalmente, para este fin de estimulación ovárica también podemos encontrar protocolos que utilicen la gonadotropina menopáusica humana (hGM). Esta se extrae de la orina de las mujeres menopáusicas y tiene actividad tanto de LH como FSH (Riviere y Papich, 2018). Teóricamente presenta la misma cantidad de ambas hormonas de tal manera que trabajan al mismo tiempo. La FSH va reclutando y aumentando el tamaño de los folículos mientras que la LH es necesaria para la maduración. En teoría no hay peligro de ovulación prematura ya que no habría un pico de LH sino dosis constantes (Escudero, 2012). Aunque esta no se suele utilizar en veterinaria (Riviere y Papich, 2018). No obstante, es muy utilizada en los ciclos de fecundación in vitro (FIV) para mujeres. Ha habido diferentes estudios comparando su acción con la rFSH, llegando a la conclusión que con la hMG se consigue un mayor ratio de beneficio-riesgo y mayor número de nacidos. Por la información recolectada se puede determinar que la actividad LH de la hGM es más similar a la acción de la hCG que a la auténtica LH (Coomarasamy et al., 2008; Platteau et al., 2008). Los estudios comentados también coinciden en la necesidad de más información y más pruebas para validar la afirmación de que el uso de la hGM es mejor que la rFSH para su uso en los ciclos de FIV.

Hay diferentes protocolos en los que se utiliza esta gonadotropina junto con otras hormonas con la intención de mejorar la estimulación ovárica. Un ejemplo, es el uso de busarelina (análogo de GnRH) junto con la hGM (protocolo largo). De hecho hay estudios que comparan la acción conjunta de estas hormonas con la acción de la busarelina junto con la hGM y hCG (protocolo corto), siendo la primera opción más efectiva, aunque con la necesidad de seguir investigando (Tarlatzis et al., 1993).

En algunos estudios referentes a los tratamientos de hiperestimulación utilizando antagonistas de GnRH conjuntamente con la hMG se apunta a la necesidad de una suplementación de hCG en la fase lútea para mejorar el ratio de gestación (Belaisch-Allart et al., 1990).

Ha habido diferentes estudios tratando de evaluar el efecto de unas y otras (hipofisiarias, séricas y urinarias purificadas y, recombinantes) sobre la estimulación a nivel ovárico y sobre la calidad de los óvulos y embriones obtenidos. Las gonadotropinas hipofisiarias fueron descartadas del uso clínico por estar relacionadas con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y las séricas por problemas de consistencia en los resultados (Lunenfeld, 2011; Cochius et

al., 1990). En cuanto a las urinarias y recombinantes, estas últimas, concretamente en el caso de la FSH (rFSH), parecen aportar un mayor control sobre la respuesta y la calidad de óvulos (Out et al., 1995). No obstante, los resultados siguen siendo controvertidos y dependen de las hormonas, dosis, protocolos comparados y de la especie en la que se aplican), ya que en otros estudios se llegó a la conclusión de que purificadas de origen urinario y rFSH eran igualmente efectivas (Al-inany et al., 2003). Además, el coste final por óvulo y embrión puede ser tenido en cuenta en algunas especies siendo más económica la rFSH (Revelli et al., 2006).

La GnRH, que también ha sido comentada anteriormente, tiene la función natural de liberar LH y FSH. No obstante, artificialmente se obtienen GnRH sintéticos análogos que varían en unos péptidos específicos de la GnRH original (Alvariño y Rebollar, 1995) de acción prolongada como triptorelina, buserelina, etc. Finalmente, la gonadorelina (forma natural) dejó de comercializarse en España. Esta hormona se puede suministrar a las hembras de forma exógena por vía intramuscular o venosa, ya que por vía oral se absorbe muy lentamente (Fernández et al., 2015), para que libere FSH y LH (Alvariño y Rebollar, 1995). Aunque en la mayoría de los casos su aplicación se realiza tras un protocolo de estimulación o a la inseminación para inducir la ovulación (Quintela et al., 2004). Se ha reseñado que cuando se administra después de una monta, cabe la posibilidad de que se ovulen ovocitos inmaduros que no tengan la capacidad para ser fecundados o la competencia para continuar con la embriogénesis (Roustan y Maillot., 1991). Por ello, es complicado predecir la potencialidad real que podría obtenerse con el uso de análogos de gonadotropinas, ya que su utilidad es más clara cuando las granjas están en condiciones deficientes de manejo, salud o ambiental. Aun así, se estima que para una granja de condiciones estándar se puede conseguir un aumento del 10% en fertilidad (Alvariño y Rebollar, 1995).

El uso de antagonistas de esta gonadotropina como cetrorelix o ganirelix, entre otros, (Fernández et al., 2015) también es frecuente en los tratamientos de estimulación ováricas. Los antagonistas se utilizan para evitar un pico de LH prematuro que puede conllevar diferentes aspectos negativos para la estimulación, como una luteinización prematura, arresto de la maduración folicular y la asincronía de la maduración de los ovocitos (Tarlantzis et al., 2006). Así pues, con el objetivo de encontrar el tratamiento óptimo las gonadotropinas antagonistas se han utilizado conjuntamente con otras hormonas, por ejemplo, la LH para suplementar la fase folicular (Cedrin-Durnerin et al., 2004), o utilizar un protocolo con antagonistas en el que finalmente se utilizan agonistas para la maduración final de los ovocitos (Griesinger et al., 2006).

Las gonadotropinas agonistas también se pueden utilizar para evitar ese pico de LH prematuro, no obstante, su administración debe ser con 7 días de antelación. En cambio, las antagonistas producen este efecto inmediatamente adhiriéndose a los receptores e impidiendo las secreciones de gonadotropinas y hormonas esteroideas (Klingmüller et al., 1993)

El uso de gonadotropinas antagonistas frente agonistas presenta muchas ventajas como la menor dificultad y tiempo en prevenir el pico de LH o la ausencia de quistes debido a una estimulación inicial que puede suceder con el uso de agonistas. No obstante, también muestra desventajas como un menor ratio de embarazos frente a los obtenidos con agonistas (Tarlantzis et al., 2006).

1.3. Efectos de los tratamientos de superovulación sobre la calidad ovocitaria y embrionaria.

El objetivo del uso de la superovulación es obtener más embriones transferibles por ciclo e incrementar las probabilidades de embarazo. No obstante, esta puede acarrear diferentes problemas.

La estimulación con gonadotropinas, está asociada con complicaciones y efectos secundarios indeseables, más concretamente el síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS) (Wang et al., 2006). Además, el uso repetido de estas hormonas durante mucho tiempo podría suponer un incremento de riesgo en el cáncer de ovario (Brinton et al., 2005).

El hecho de alterar el ciclo natural con la superestimulación también ha afectado a la fertilidad en diferentes especies (Ertzeid y Storeng, 1992). Esto puede deberse a que en varios estudios muestran una relación negativa de estos tratamientos con la calidad y maduración del ovocito (Uysal et al., 2017). Durante la foliculogénesis todos los procesos de maduración ovocitaria pueden verse modificados por las hormonas exógenas. Estos procesos incluyen la redistribución y segregación de cromosomas durante la meiosis (Ferreira et al., 2009). En el estudio de Cortell et al. (2015) han podido relacionar un tipo específico de superovulación y la alteración del metabolismo del ATP (adenosina trifosfato). La concentración de esta molécula es altamente relevante ya que para que el ovocito complete la maduración debe pasar por diferentes procesos que son altamente demandantes energéticamente. Por lo tanto, existe una estrecha relación entre la concentración de ATP y la competencia del embrión (Cortell et al., 2015), que puede verse alterada con tratamientos de superovulación específicos.

Además, se ha documentado una alteración en la expresión génica de los ovocitos provenientes de la superestimulación en diferentes genes. La PTTG1 es una proteína necesaria para la correcta segregación de cromosomas y en la reparación del DNA. Esta proteína se encuentra sobreexpresada en los ovocitos recogidos de una hiperestimulación en vacas (Chu et al., 2012). También se encuentran en mayor expresión en los tumores pituitarios comparando con los tejidos sanos pituitarios (Zhang et al, 2008). Hay otros genes como BTG4, PAPOLA, LEO1 y GDF9 que también se encuentran sobreexpresados en los ovocitos obtenidos de hembras superovuladas (Chu et al., 2012). El primero de ellos es un factor necesario en el ciclo celular que desencadena la degradación del el mRNA materno del ovocito (Yu et al.,2016) y, por tanto, se cree que una de sus funciones podría estar implicada en la activación del genoma del embrión. LEO1 está asociado con la regulación de la transcripción a través de la modificación de las histonas (Chu et al., 2012).

En diversos casos se ha mostrado que existen mayores anomalías cromosómica en embriones que provienen de hembras murinas superestimuladas (Elbling y Colot, 1985; 1987; Luckett y Mukherjee, 1986). El mismo fenómeno fue documentado en conejos con la administración de hormonas eCG y hCG (Fujimoto et al., 1974).

También se demostró en el estudio de Carney y Foot en 1990 que los embriones que provienen de conejas superovuladas con GnRH presentaban un menor número de células y una velocidad de división más lenta in vivo.

Además, pueden verse afectados los mecanismos epigenéticos (Uysal et al., 2017). El hecho de usar gonadotropinas puede forzar al ovario a madurar los ovocitos demasiado rápido de forma que la metilación de la impronta genómica puede verse alterada. La impronta genómica es un proceso que empieza en una fase muy temprana del crecimiento del ovocito, donde genes específicos se van metilando, consiguiendo una metilación total en un estadio más desarrollado del ovocito (Fortier et al., 2008). Se observó un incremento anómalo de la expresión del 5-metil-cisteína, forma metilada del ADN, en embriones de dos células provenientes de superovulación (Shi y Haaf, 2002). Se da por sentado que la impronta que quedaría marcada o mal desarrollada sería la materna. No obstante, hay indicios en algunos estudios de que no es el proceso de metilación lo que se ve afectado sino el mantenimiento de esta durante el proceso embrionario. Así pues, el gen H19 debe estar totalmente suprimido en la impronta paterna, no obstante, en la mayoría de placentas de embriones provenientes de hembras superovuladas se detectó una expresión bialélica de este gen. Aún se desconoce si son en sí las propias hormonas las que alteran el proceso o si el fallo de metilación proviene de

folículos que ya habían entrado en fase de atresia y fueron rescatados (Fortier et al., 2008). La alteración de la impronta genómica por hiperestimulación está muy investigada en ratones y humanos (Shi y Haaf, 2002; Fortier et al., 2008; Li et al., 2011; Nelissen et al., 2013; Uysal et al., 2017).

Además, la superovulación puede afectar a los embriones también indirectamente modificando el tracto de la hembra, ya que el número de células de los embriones es mayor si el embrión es transferido a hembras no superovuladas. Podría haber diferentes razones para ello. Una explicación podría ser que la superestimulación acelera el recorrido del embrión (Hawk, 1988), llegando de forma más temprana al útero y por ello no presentar las condiciones óptimas para recibirlo. El descenso del ratio de implantación, el crecimiento fetal retardado o el retraso en el desarrollo del embrión documentados (Uysal et al., 2017) podría explicarse por este fenómeno entre otras razones.

Para que un ovocito sea competente debe ser capaz de reanudar la meiosis, descomponer la cabeza del espermatozoide para que se produzca la fecundación, desarrollar la etapa de blastocisto, inducir al embarazo y todo ello de manera correcta (Sirard et al., 2006). No obstante, como se ha comentado todas estas funciones pueden verse alteradas con tratamientos de superestimulación, afectando a su calidad.

La superovulación también puede afectar a la viabilidad de los ovocitos y embriones cuando se aplican técnicas de reproducción asistida como la criopreservación, es decir que provoca un aumento de la sensibilidad a la criopreservación. Los embriones criopreservados de hembras superovuladas tienen un descenso de la viabilidad mucho más acusado en comparación con los que no son criopreservados, utilizando para la superovulación hormonas como la FSH o la eCG. Además, después de las transferencias también se produce un descenso importante respecto a la tasa de nacidos totales y nacidos vivos (Mehaisen et al., 2006).

1.4. Factores que influyen la respuesta a los tratamientos.

A parte de los efectos negativos que puede conllevar el uso de gonadotropinas como hemos visto en el punto anterior, uno de los mayores problemas del uso de hormonas para la sobreestimulación es la variabilidad de la respuesta ovárica. Dependiendo de esta variabilidad los parámetros por excelencia de la reproducción que serían el ratio de fecundación y el desarrollo embrionario también cambiarán consecuentemente (Viudes-de- Castro et al., 2009). Además, aunque es cierto que la baja respuesta es un problema, el hecho de tener una respuesta demasiado elevada puede conllevar problemas de salud como el OHSS, comentado anteriormente. Por eso es necesario intentar predecirla (Boudjenah et al., 2012).

La variabilidad de la respuesta ovárica recae en diferentes factores, como el propio tratamiento. También puede suceder como en el caso de la FSH que puede estar relacionado con el método de obtención, ya que si se extrae de la glándula pineal el ratio LH/FSH es desconocido de tal manera que puede ser un factor para la variabilidad de la respuesta ovárica (Murphy et al., 1984). No obstante, con el mismo tratamiento los individuos muestran variabilidad a la respuesta, ya que, aunque la actividad reproductiva recaiga en el axis HPO hay diferentes factores como la edad, la nutrición, el ambiente o el genotipo, que pueden modificar la liberación de las hormonas (Castellini et al, 2010) y que se discutirán con más profundidad a continuación.

1.4.1. Edad.

La edad es un parámetro muy importante, pues una avanzada edad se ha relacionado con un descenso en la fertilidad en algunos mamíferos (Erickson, 1966; Erickson et al., 1976; Talbert, 1978). Conforme transcurre la edad se presentan problemas de fertilidad por posibles

diferentes razones; disminución de la población de ovocitos (Ingram et al., 1958) cambios en calidad de los ovocitos y, consecuentemente, disminución de embriones obtenidos (Hasler et al., 1983), frecuencia variada de la ovulación e ineficiencia de esta, condiciones del útero modificadas, funcionalidad sexual y/o riesgos asociados con llevar a cabo un embarazo y un parto en una edad avanzada (Tiwari-Pandey y Ram, 2009). Además, en una edad reproductivamente vieja se producen variaciones en el axis HPO, lo que podría ser uno de los motivos de la reducción de la respuesta ovárica a los tratamientos hormonales (Tarlantzis y Zepiridis, 2003). En animales esta desventaja no suele ser tan frecuente como en humanos, ya que los animales no se usarían con este fin si no son reproductivamente provechosos. No obstante, cuando el animal es de gran valor genético hay un interés adicional para seguir trabajando en este ámbito con él y es cuando la edad avanzada presenta un problema (Lerner et al., 1986).

Hay que tener en cuenta también que si la hembra es muy joven es muy probable que no responda al tratamiento de hormonas que se le administre (Hertz y Hisaw, 1934). Se ha observado que la edad mínima para conseguir unos resultados satisfactorios con conejos superovulados es alrededor de 16 semanas o más, siendo necesario el comienzo de la formación del folículo antral. Así pues, la edad es un factor clave para elegir a las conejas jóvenes (Kennelly y Foote., 1965).

En el estudio de Hasler et al. en 1981 se reportó la variabilidad de la respuesta ovárica acorde con la edad de la vaca. Más óvulos fueron obtenidos en una franja de edad de 3 a 10 años. La franja de edad que más embriones recogieron fue entre 3 y 6 años. Por lo tanto, en este estudio se verifica la necesidad de llegar a una edad reproductiva para poder responder a los tratamientos. También se demuestra, acorde con otros estudios posteriores del mismo grupo, como la respuesta ovulatoria de las vacas disminuye a los 10 años de edad (Hasler et al., 1983).

Además, la respuesta ovárica no sólo disminuye, sino que también aumenta su variabilidad (Kagabu y Umezu, 2006).

Para intentar solucionar este problema se están desarrollando propuestas para mejorar la respuesta ovárica de conejos viejas como la acción conjunta de lípidos poliinsaturados con la eCG (Elkomy y El-Speiy ,2015).

En cuanto a la especie humana el límite de reproducción suele estar alrededor de los 30 aunque es más notorio en los 35-40 años (Tarlantzis y Zepiridis, 2003).

En conclusión, se establece que la capacidad de reproducción empieza en la pubertad incrementa por un corto tiempo y luego decrece, en algunas especies (Larson et al., 1973).

1.4.2. Nutrición y sobrepeso.

El efecto de la nutrición es un efecto altamente relevante para la estimulación ovárica. Se ha demostrado que el cambio de nutrición con un periodo corto puede provocar cambios en la morfología del ovocito, su desarrollo in vitro y, además, modificar la calidad del embrión (Lozano et al., 2003). De por si la obesidad ya presenta un problema de salud afectando a la fertilidad, tanto masculina como femenina (Balasubramanian et al., 2012). El sobrepeso está relacionado con un menor número de ovocitos fecundados y menor tasa de embarazos, así como nacidos vivos (Sohrabi et al., 2015). Se cree que la exposición a una dieta de contenido alto en grasa puede alterar el axis HPO disminuyendo las oleadas de LH, pero esto varía en algunos estudios, posiblemente por los distintos tiempos de exposición a esta dieta (Balasubramanian et al, 2012)

Así pues, las dietas ad libitum (sin restricción) han demostrado ser bastante incompatibles con el proceso de superestimulación, aparte de que las hembras presentan un comportamiento estridente, también se observa un menor ratio de ovulación compradas con

las dietas control o de baja nutrición (Lozano et al., 2003). En el ámbito de la superovulación una nutrición excesiva altera más negativamente que una nutrición deficiente el número de folículos con un diámetro adecuado (Nolan et al., 1998) así como el correcto ratio de ovulación (Yaakub et al., 1999). Además, una dieta en exceso de energía afecta también al desarrollo del embrión, y este efecto, al menos parcialmente es debido a la competencia del ovocito, antes de la fertilización (Lozano et al, 2003).

Parece ser que con la dieta ad libitum descenden los niveles de progesterona en la vena yugular, en la periferia, hormona clave para la adecuación del embrión. No obstante, parece que su concentración no está relacionada con la del útero, por ello se necesita una investigación más profunda y ver cómo es afectada esta concentración a nivel de útero y de ovario (Lozano et al., 2003).

En el estudio de Naturil-Alfonso et al. (2003) se probó en una línea conservado por su rápido desarrollo y el peso final adulto, las hembras que no ovularon tenían un peso mayor (de prácticamente un kilogramo) que las que ovularon. Así pues, estas primeras mostraban valores diferentes en cuanto a concentración de LH, glucosa, leptina, ácidos grasos no esterificados (NEFA) y beta-hidroxibutirato (BOHB), lo que podría explicar el fallo en la ovulación.

1.4.3. Ambiental.

La optimización de la reproducción necesita tener en cuenta diferentes parámetros que puedan afectar a la estimulación, como es el ambiente y la salud.

En las vacas el estrés térmico es muy problemático ya que en vacas lactantes puede producirse ese estrés a temperaturas tan bajas como 27 grados (Berman et al, 1895) que puede alterar negativamente muchos parámetros reproductivos como el comportamiento, la calidad ovocitaria o el desarrollo embrionario que se vuelve retardado (Hansen et al., 2001; Hansen, 2007). También produce cambios en la dinámica folicular (Wolfenson et al., 2000). El estrés térmico afectando a esos parámetros reduce la fertilidad, aunque es complicado hacer un estudio in vivo. En una investigación in vitro se midió la respuesta a las gonadotropinas de los folículos acorde con el calor donde se alteraron las secreciones. Cuanto mayor era el calor, menor secreción de androstenediona y esteroides se producía. En cambio, la concentración de progesterona subía, indicando una luteinización prematura (Bridges et al., 2005).

En ambiente salvaje, los animales, como los conejos, suelen tener periodos fijados de tiempo, estaciones, para reproducirse donde el estrés ambiental es menor, por ejemplo, un clima más apto y disponibilidad de comida (Wells et al., 2016).

Para los conejos domésticos la temporada no es un factor altamente relevante cuando están siendo tratados con hormonas, no obstante, sí que es cierto que durante los meses de enero, febrero y marzo la respuesta ovulatoria es mejor que en octubre, noviembre y diciembre. La variabilidad de la ovulación y la respuesta ovárica es más notoria entre los individuos que entre las estaciones o años. De tal forma que los parámetros que podrían aportar esa variabilidad serían el peso, la genética o la edad de las conejas (Hafez, 1964).

Cabe recalcar que, aunque el uso de gonadotropinas puede paliar el efecto estacional (Alvariño y Rebollar, 1995), es necesario tener en buenas condiciones a los individuos (buena temperatura, ventilación, humedad relativa) para que las conejas estén receptivas sexualmente (Martín, 2016) y, además, que este factor no influya sobre la respuesta ovárica.

1.4.4. Genotipo

La farmacocinesis describe una relación entre la variabilidad de los genes y la respuesta a diferentes fármacos (Greb et al., 2005). Hay diferentes genes que están implicados en la reproducción, por lo tanto, no es de extrañar que la respuesta ovárica sea distinta acorde a ellos.

En concreto hay investigaciones sobre polimorfismos SNPs, que pueden variar entre la población siendo más beneficiosos unos que otros para la respuesta ovárica, como los que afectan a las rutas de la gonadotropina o esteroides (Boudjenah et al., 2012).

La mayoría de los SNPs estudiados son los encontrados en los receptores de las hormonas relacionadas con la respuesta ovárica como el receptor de FSH o de estrógenos (Greb et al, 2005). El primer estudio realizado se hizo al polimorfismo Asn680Ser del receptor de FSH que afecta a los niveles basales de FSH e incrementa los requerimientos de gonadotropina durante la estimulación (De Castro et al., 2003).

Algunos polimorfismos no prueban tener una relación causal acorde con la variabilidad en la respuesta ovárica. Pero hay estudios que han encontrado una relación directa presentando homocigosis para el polimorfismo, por ejemplo, el genotipo Ser 680. Este SNP en homocigosis presentaba una resistencia a la FSH más alta y por ello las mujeres que lo presentaban tenían una respuesta más baja que las que presentaban la variante Asn 680 en homocigosis (Greb et al., 2005). En los diferentes estudios se plantea la posibilidad que para conseguir la misma respuesta que las mujeres con Asn 680 se necesitaría una mayor dosis por la hipótesis de que las que presentan el polimorfismo Ser 680 poseen un umbral de FSH más alto. No obstante, hay estudios que, aunque aumentarían un 50% la dosis respecto al control, notaron muy poca diferencia entre las respuestas ováricas de los grupos (Behre et al., 2005).

Aunque la concentración de la hormona anti mülleriana (AMH) en el suero es un indicador de baja respuesta, no se ha encontrado relación con los polimorfismos que presenta este gen y su receptor AMH RII (Goodmana et al., 2014).

Así pues, existe una relación entre algunos genes y la respuesta ovárica de los individuos. No obstante, se debe continuar con la investigación de qué genes están relacionados y cómo.

2.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO

Los objetivos del trabajo de Fin de Grado son los siguientes:

- ❖ Evaluar el efecto de la superestimulación ovárica con rhFSH-CTP (Coriofolitropina alfa) suplementada con hCG sobre los parámetros de la inducción a la ovulación, tasa de ovulación, número de embriones morfológicamente normales recuperados por coneja y sobre la viabilidad in vivo de estos embriones.
- ❖ Analizar y comparar la respuesta al tratamiento de dos líneas genéticas de conejo que difieren en sus características de crecimiento y reproductivas.

3.

MATERIALES Y
MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

El diseño experimental se muestra de forma esquemática en la Figura 2.

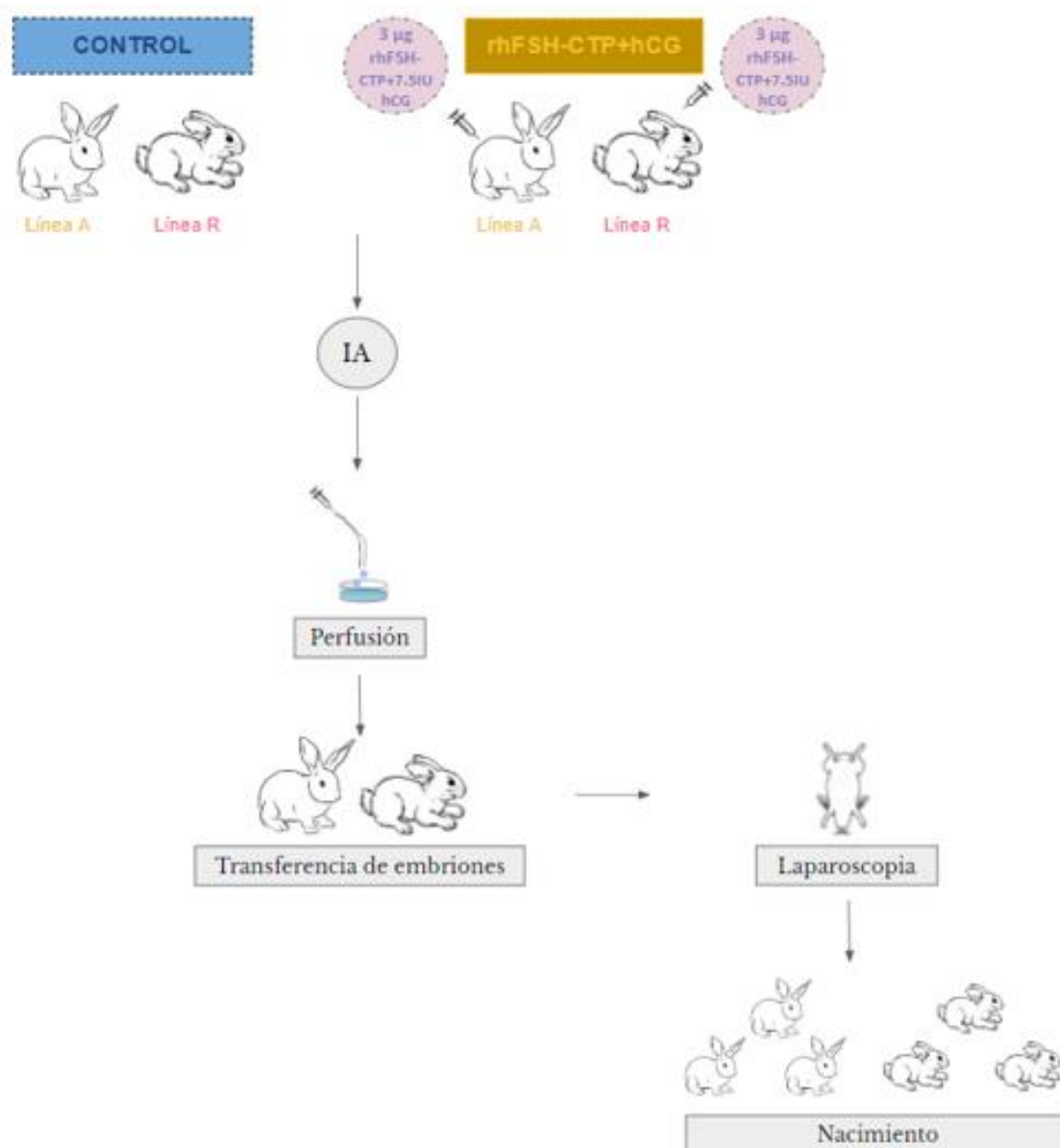


Figura 2. Diseño experimental.

3.2. Animales y alojamientos

Los animales que se utilizaron para realizar el experimento fueron facilitados por las granjas cunícolas del Grupo de Mejora Genética Animal del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universidad Politècnica de València. Para realizar el experimento se emplearon 49 hembras donantes de embriones de la línea amarilla A de origen Neozelandés Blanco seleccionadas desde 1980 por tamaño de camada y 52 hembras donadoras de embriones de la

línea R, seleccionada desde 1989 por su tasa de crecimiento desde el deteste hasta el sacrificio. Como receptoras se utilizaron 18 hembras de cada línea. Estas tenían entre 4,5 y 5 meses de edad y fueron inseminadas con semen de machos de entre 8 y 12 meses de edad.

Los conejos fueron alojados en jaulas individuales bajo parámetros ambientales controlados. Las horas de luz fueron 16 mientras que las de oscuridad 8, el intervalo de temperatura fue de 17.5°C a 25.5°C y se tuvo acceso libre a pienso y agua filtrada.

Todos los conejos fueron manejados de acuerdo con los procedimientos aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universitat Politècnica de València y la Generalitat Valenciana (2015/VSC/PEA/00061) para la instalación cunícola nºde registro 250V091 de acuerdo con la Directiva de la unión Europea 2010/63.

3.3. Tratamiento de superovulación e inseminación.

Las conejas de cada línea fueron distribuidas en dos grupos.

- Grupo 1 (control): 42 conejas no superovuladas, 21 de la línea A y 21 de la línea R.
- Grupo 2 (rhFSH-CTP+hCG): 59 conejas superovuladas con 3µg rhFSH-CTP (Elonva, Merck Sharp- Dohme) + 7,5 U.I. de hCG (Coriogon, Laboratorio Ovejero) 72 h antes de la inseminación, 28 de la línea A y 31 de la línea R.

Las conejas fueron inseminadas con 0.5 ml y 20 millones de espermatozoides mediante una cánula curvada de inseminación que depositó el semen en el fondo de la vagina. El semen utilizado fue una mezcla heterosperma a partir del semen de tres machos diluido con Tris-cítricoglucosa (0'25 M Tris (hidroximetil) aminometano, 83 mM ácido cítrico, 47 mM Glucosa), pH=6,9.

El semen de los conejos fue recuperado mediante vagina artificial acorde con el método descrito en Vicente et al. (2011). Para el uso del semen para la IA este debe pasar los requisitos de calidad mínimos: movilidad espermática mayor al 70% y porcentaje de espermatozoides anormales menos al 25% (Marco et al., 2010). Con el fin de evaluar su motilidad se tomó una alícuota del semen diluido en una disolución con Tris-Citrato-Glucosa 1:5 [0'25 M Tris (hidroximetil) aminometano, 83 mM ácido cítrico, 47 mM Glucosa] y se depositó en la cámara Makler. Para el cálculo de la concentración se empleó una cámara Thoma mediante una dilución del semen 1:10 con glutaraldehído (Glutaraldehído al 2% en solución tamponada fosfato). También se observó la morfología utilizando un microscopio óptico de contraste de fases a 400x, a temperatura ambiente.

Tras la inseminación se indujo la ovulación administrando un análogo de GnRH (1 µg de acetato de buserelina (Suprefact, Sanofi-Aventis)

3.4. Obtención y catalogación de embriones.

A las 72 horas de la inducción de la ovulación, las conejas fueron sacrificadas vía la administración intravenosa de 0'6 g de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol especialidades veterinarias, S.A., Vétoquinol, Madrid, Spain) y se les extirpó el aparato reproductor con la finalidad de recuperar los embriones.

Se realizó la perfusión de cuellos uterinos y oviductos con el medio tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS, Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con 0.1% (v/w) de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma, St. Louis, MO, USA) y atemperado a 37°C.

El medio de perfusión fue recogido en placas Petri estériles de 60mm y óvulos y embriones fueron lavados tres veces y catalogados a 40x en una lupa. En la catalogación de los embriones se tuvo en cuenta su estadio de desarrollo (óvulos, embriones 2 a 16 células, mórulas

y blastocistos tempranos) y como criterios de calidad se estableció la correspondencia con la cronología de la especie (72 horas post-inducción de la ovulación corresponde con el estadio de mórula y blastocisto temprano), la homogeneidad de las células y la simetría de zona pelúcida y cubierta de mucina (EQ1).

Tras la perfusión y catalogación de los embriones se definieron los siguientes parámetros:

- Inducción de la ovulación (IO): porcentaje de conejas que presentaban folículos con cicatriz de ovulación en sus ovarios respecto del total de cada grupo experimental.
- Tasa de ovulación (TO): corresponde con el número de folículos con cicatriz de ovulación de ambos ovarios de una coneja.
- Eficiencia total de recuperación(ERT): porcentaje entre el número de óvulos y embriones recuperados respecto a la tasa de ovulación.
- Embriones morfológicamente normales (ERQ1): número de embriones en estadio de mórula o blastocisto temprano con homogeneidad celular y cubiertas esféricas.
- Índice de normalidad (IN): porcentaje de embriones normales sobre el total recuperado.

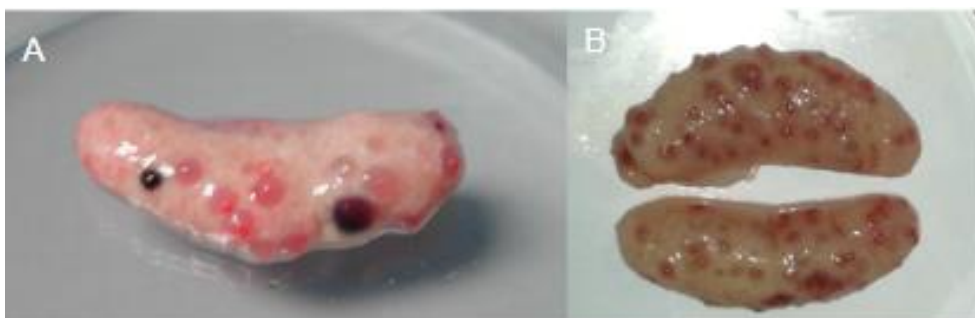


Figura 3. Ovarios de conejas utilizadas en este experimento. A. Ovario de hembra no tratada. B. Ovarios de hembras tratadas.

3.5. Transferencia de embriones

Un total de 430 embriones fueron transferidos, 218 de la línea A y 212 de la línea R a 36 hembras receptoras que habían sido inducidas a ovular. 72 horas antes de la transferencia con 1ug de acetato de buserelina. Las hembras receptoras fueron de la línea A y R, recibiendo los embriones de su misma línea y fueron seleccionadas por su estado de celo o receptividad basándose en el color y la turgencia de la vulva.

Se anestesiaron a las hembras sincronizadas con una inyección intramuscular de 16 mg de xilacina (Rompún, Bayer AG, Leverkusen, Alemania) seguida de una inyección intravenosa de 16-20 mg de hidrocloreuro de ketamina (Imalgène, Merial SA, Lyon, Francia). Se prosiguió con la transferencia de embriones utilizando la técnica de laparoscopia descrito por Besenfelder et al. (2000) y García-Domínguez et al. (2019).

El número de embriones transferidos por hembra fue en torno a 12 (de 11 a 13). Cuando finalizó la transferencia, las conejas fueron inyectadas intramuscularmente con 0,5 ml de enrofloxacina (Baytril 5%, Bayer, Barcelona, España) y fueron devueltas a sus jaulas individuales y alimentadas ad libitum con una dieta estándar y con libre acceso a agua.

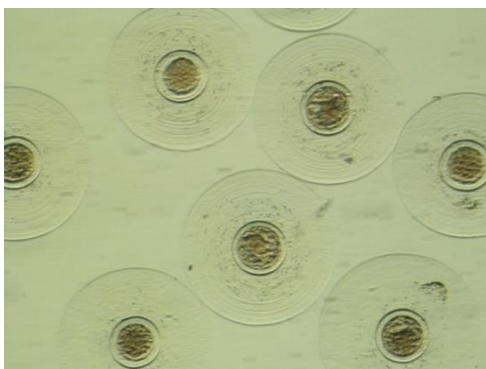


Figura 4. Mórulas y blastocistos tempranos de conejo recuperados 72h post-inducción de la ovulación (100X).

3.6. Laparoscopia para determinar la tasa de implantación.

Tras doce días de la ovulación inducida de las hembras receptoras de embriones, a estas se les realizó una laparoscopia y se anotó el número de embriones implantados por hembra. Para realizar la laparoscopia los animales fueron anestesiados de la misma forma que se indica en el punto anterior. Al parto se anotaron el número de gazapos nacidos totales y vivos.

A partir de estos registros se calculó:

- El porcentaje de pérdidas fetales durante la gestación como la relación entre el número de nacidos y el número de implantados por coneja (PF).
- El porcentaje de pérdidas al parto como la relación entre el número de nacidos vivos y el de nacidos totales por parto (PP)

3.7. Análisis estadístico

Con la finalidad de evaluar el efecto del tratamiento y de la línea sobre la inducción a la ovulación se realizó un análisis Chi-cuadrado con corrección de Yate's.

Para estudiar el efecto sobre la tasa de ovulación, la eficiencia total de recuperación (ERT), el número de embriones recuperados (ERQ1) y la eficiencia de recuperación de embriones normales (Eficiencia EQ1), el índice de normalidad (IN), el número de nacidos totales (NT) y los porcentajes de pérdidas fetales (PF) y perinatales (PP) se realizó un análisis de varianza utilizando un modelo lineal general que comprendía como factores fijos línea, tratamiento y su interacción. En el análisis del número de embriones implantados y nacidos totales al parto se utilizó como covariable el número de embriones transferidos.

Se empleó el software SPSS 26 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2020) para realizar todos los análisis estadísticos.

4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la estimulación ovárica con coriofolitropina alfa y hCG (rhFSH-CTP+hCG) y de línea genética sobre respuesta de las conejas donantes de embriones.

4.1.1 Efectos sobre la inducción a la ovulación (IO).

El porcentaje de conejas inducidas a ovular no fue afectado significativamente ni por el tratamiento con rhFSH-CTP+hCG ni por la línea genética, sin embargo, es necesario reseñar que 7 conejas no llegaron a ovular (11,9%, Tabla 1, Figura 5).

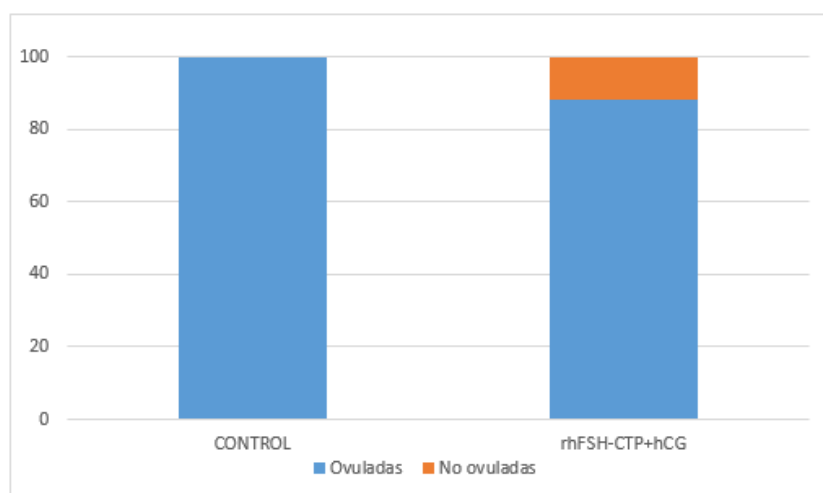


Figura 5. Efecto del tratamiento sobre la inducción a la ovulación.

En estudios previos donde se aplicó la coriofolitropina alfa (rhFSH-CTP) a la línea A sí se obtuvo un significativo menor porcentaje de hembras que ovularon respecto al control (80% vs 100%, Viudes-de-Castro et al., 2017). Además, en otros protocolos con el uso de otras gonadotropinas como la rhFSH (Viudes-de-Castro et al., 2009) o combinaciones de ellas como FSH-CTP+LH, rhFSH, rhFSH+rhLH (Viudes-de-Castro et al., 2017), se observó que los tratamientos con gonadotropinas exógenas para superovular interfieren sobre la inducción a la ovulación provocando que un número variable de conejas tratadas no lleguen a ovular. Posiblemente esto se deba a que los tratamientos de estimulación ovárica pueden inducir a procesos anovulatorios en algunas hembras donadoras (Viudes-de-Castro et al., 2017). Una posible razón puede ser la asociación de la administración exógena de gonadotropinas con la alteración de la liberación pulsátil de LH que disminuye, así como su concentración antes de la luteólisis inducida debido a un aumento en la concentración plasmática de progesterona y estradiol (Gosselin et al., 2000) interfiriendo en la retroalimentación positiva del estradiol sobre la secreción de LH y así bloqueando la ovulación. En el presente estudio, el tratamiento de estimulación ovárica incluía no solo rhFSH-CTP sino además 7.5 UI de hCG, ésta última es una gonadotropina con actividad LH con una vida media en sangre mucho mayor que la LH recombinante e hipofisaria (Rao, 1979; Ezcurra y Humaidan, 2014). Quizá, un efecto más prolongado de la LH podría favorecer un mejor desarrollo folicular y con ello que una menor proporción de conejas fallen a inducir la ovulación.

Tabla1. Inducción a la ovulación, tasa de ovulación, eficiencia de recuperación total, índice de normalidad y número de embriones morfológicamente normales atendiendo a criterios morfológicos y de cronología.

| Factor | Nº | IO (%) | TO (lsm±es) | ERT (%) (lsm±es) | IN (%) (lsm±es) | ERQ1 (lsm±es) |
|--------------------------|-----|--------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Tratamiento | | | | | | |
| Control | 42 | 100,0 | 11,5 ± 3,00 ^b | 88,2 ± 3,05 ^a | 90,7 ± 3,75 | 9,3 ± 2,39 ^b |
| rhFSH-CTP+hCG | 59 | 88,1 | 57,8 ± 2,70 ^a | 73,0 ± 2,71 ^b | 87,6 ± 3,37 | 37,1 ± 2,13 ^a |
| Línea | | | | | | |
| A | 49 | 91,8 | 34,4 ± 2,90 | 82,9 ± 2,92 | 94,9 ± 3,59 ^a | 27,2 ± 2,29 ^a |
| R | 52 | 94,2 | 34,8 ± 2,80 | 78,4 ± 2,86 | 83,4 ± 3,55 ^b | 19,3 ± 2,24 ^b |
| Tratamiento*línea | | | | | | |
| Control*línea A | 21 | 100,0 | 12,0 ± 4,24 | 81,5 ± 4,26 ^b | 99,1 ± 5,24 | 9,6 ± 3,34 ^c |
| rhFSH-CTP+hCG*línea A | 21 | 85,7 | 56,9 ± 3,97 | 84,3 ± 3,99 ^{a,b} | 90,7 ± 4,91 | 44,7 ± 3,13 ^a |
| Control*línea R | 28 | 100,0 | 10,9 ± 4,24 | 94,9 ± 4,37 ^a | 82,3 ± 5,37 | 9,1 ± 3,43 ^c |
| rhFSH-CTP+hCG*línea R | 31 | 90,3 | 58,8 ± 3,67 | 61,8 ± 3,69 ^c | 84,4 ± 4,62 | 29,6 ± 2,90 ^b |
| Total | 101 | 93,1 | 34,6 ± 2,02 | 80,6 ± 2,04 | 89,1 ± 2,52 | 23,2 ± 1,60 |

Nº: número de conejas por grupo. IO: porcentaje de conejas que ovulan. TO: tasa de ovulación, número de folículos ovulados por coneja. ERT: eficiencia de recuperación, óvulos y embriones recuperados por coneja tras la perfusión. IN: índice normalidad, porcentaje de embriones clasificados como normales atendiendo a los criterios de calidad morfológicos. ERQ1: Número de embriones normales recuperados por coneja atendiendo a los criterios de calidad morfológica.

lsm ±es: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± erros estándar

Valores con diferente superíndice en las columnas difieren estadísticamente (P<0,05).

Cabe destacar que ambas líneas genéticas han respondido de modo similar a la IO con y sin tratamiento de estimulación. Estos datos obtenidos distan de los resultados obtenidos anteriormente para estas líneas seleccionadas de conejo sobre todo para la línea de crecimiento R, puesto que los fallos de inducción de la ovulación, en el presente estudio, no afectaron más a la línea R que a la línea A y en su conjunto fueron menores y no diferentes significativamente a los controles. Así, Vicente et al. (2012) y Naturil-Alfonso et al. (2003) observaron que en torno al 30% de las conejas de la línea R no estimuladas no ovularon y Mehaisen et al. (2005) evaluando un tratamiento de estimulación con eCG observó que entre el 24 y el 37% de las conejas de la línea R no ovularon frente al 14% de una línea maternal (similar a la línea A de este trabajo). En el caso de la línea R, seleccionada por velocidad de crecimiento durante 37 generaciones, se conoce que arrastra algunos problemas reproductivos derivados de su mayor formato y metabolismo peculiar en el que destaca unos elevados niveles de IGF-I, problemas en el metabolismo lipídico y esteroideo (Vicente et al., 2012). Naturil-Alfonso et al. (2003) encontró que el nivel de LH registrado en las hembras que no ovularon es bastante más bajo que el resto. Estas conejas tenían más peso (prácticamente una diferencia de un kilogramo) y, además, mostraron valores diferentes de la concentración de LH, glucosa, leptina, ácidos grasos no esterificados (NEFA) y beta-hidroxibutirato (BOHB) comparado con las que sí ovularon y tenían menos peso. Por lo tanto, el fallo de ovulación podría deberse a una interacción entre el tratamiento y el estatus metabólico o condición corporal en el momento de la fase folicular, ya que, en el grupo control de conejas de ésta línea y de la línea A ovularon todas las conejas (Tabla 1, Figura 5). Por lo que en posteriores trabajos podría establecerse, además de la suplementación con hCG, un protocolo previo y simple para controlar el momento de la fase folicular en la que se aplica y/o un criterio para evaluar la condición corporal y los metabolitos en sangre (NEFAs) para adecuar el protocolo de estimulación.

4.1.2 Efecto sobre la tasa de ovulación (TO).

Como se muestra en la Tabla 1 y en la Figura 6, la tasa de ovulación se incrementó notablemente tras la estimulación con rhFSH-CTP+hCG, respondiendo ambas líneas de igual forma. La respuesta superovulatoria estimada por el número de folículos que tenían cicatriz de ovulación fue en promedio 4 veces mayor a la tasa de ovulación de los controles.

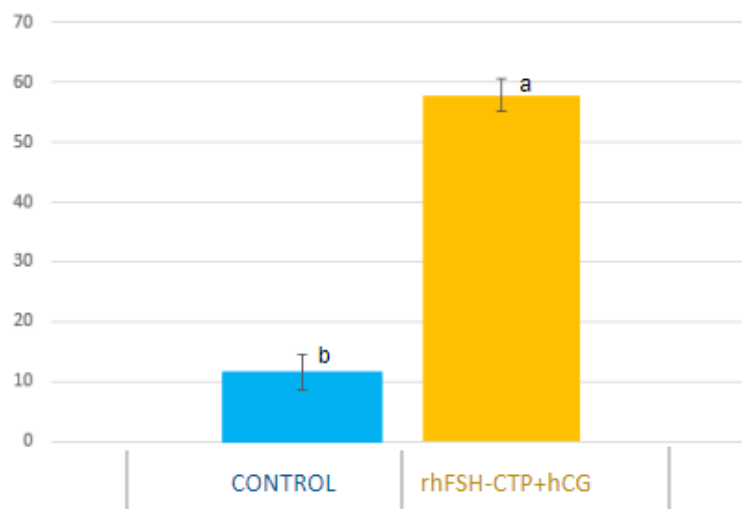


Figura 6. Efecto del tratamiento sobre la tasa de ovulación.

Valores con diferente superíndice en las columnas difieren estadísticamente ($P < 0,05$).

En estudios previos los controles tanto de la línea A como R, se obtuvieron valores similares a los obtenidos (10-13) (Vicente et al., 2003; Mehaisen et al., 2006; Vicente et al., 2012; Herreros, 2014; Mas, 2015; Viudes-de-Castro et al., 2017).

En otros estudios sobre la línea A con diferentes gonadotropinas y protocolos como pFSH, pFSH+LH (Mas, 2015), rhFSH-CTP, rhFSH-CTP+LH, rhFSH y rhFSH+LH (Viudes-de-Castro et al., 2015 y 2017) se obtuvieron valores variables (desde 20 a 50), mientras que en los protocolos basados en la coriofolitropina alfa; rhFSH-CTP, rhFSH-CTP+LH o rhFSH-CTP+hCG la tasa de ovulación obtenida fue en torno a 40-50 folículo ovulados por coneja (Viudes-de-Castro et al., 2017, 2019) cercana a la observada en el presente estudio. Cabe recalcar que mientras en Viudes-de-Castro et al. (2017) no se encontraron diferencias significativas entre los protocolos evaluados incluyendo a la rhFSH-CTP y rhFSH-CTP+LH, Viudes-de-Castro et al. (2019) sí reportó diferencias significativas para la TO entre los tratamientos de rhFSH-CTP y rhFSH-CTP+hCG, posiblemente por su mayor potencial y duración de acción frente a la LH, ya comentados anteriormente. Fortea (2017) utilizando un tratamiento basado en rhFSH-CTP observó una respuesta diferencial entre conejas jóvenes (sin partos, nulíparas de unos 5 meses de vida) era superior a las conejas adultas con al menos 4 partos y, al menos un año de edad (40,6 vs 31,5).

En cuanto a la línea R, Mehaisen et al. (2006), con un protocolo de administración de FSH hipofisaria ovina (oFSH) y eGC reportó, valores bastante inferiores referentes a este parámetro en comparación con los obtenidos en el presente estudio rhFSH-CTP+hCG (19.2 y 25 frente a los 58,8). La utilización de 3 µg de FSH-CTP y 7,5 IU de hCG en una única dosis ofreció una buena respuesta superovulatoria y no incremento los fallos de inducción de la ovulación. Este hecho es especialmente relevante para gestionar los recursos genéticos de la línea R tanto para su crioconservación ex situ si no prosigue su proceso de selección o para su difusión.

4.1.3. Efecto la eficiencia de recuperación total (ERT).

Los análisis muestran un efecto significativo del tratamiento y de la interacción línea y tratamiento, en la línea R se produce una pérdida mayor tras ser tratadas con rhFSH-CTP+hCG (de $94,9 \pm 4,37$ a $61,8 \pm 3,69$, Tabla 1, Figura 7 y 8).

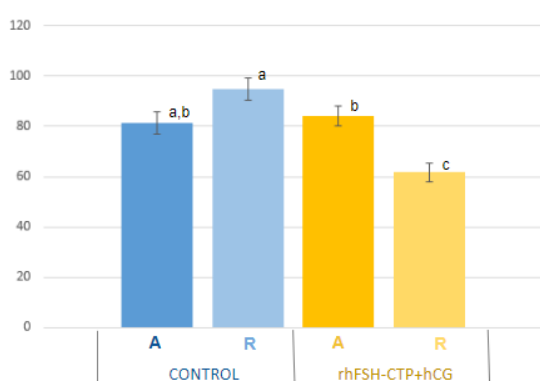


Figura 7. Porcentaje de eficiencia total.

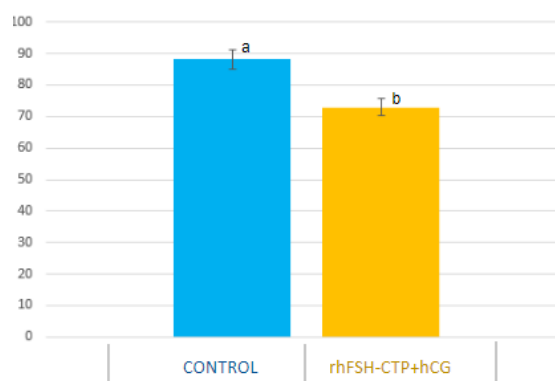


Figura 8. Porcentaje eficiencia total acorde con el tratamiento.

Valores con diferente superíndice en las columnas difieren estadísticamente ($P < 0,05$).

Las pérdidas observadas tras perfundir oviducto y útero podrían deberse a alteraciones en los patrones de movilidad de los epitelios oviductal y uterino como respuesta a modificaciones en los niveles de estrógenos y progesterona derivadas de los tratamientos de estimulación ovárica. Los efectos podrían afectar a la capacitación espermática, al proceso de fecundación, al posterior desarrollo embrionario y a su desplazamiento y posicionamiento en el endometrio (Guthrie et al., 1997; Viudes-de-Castro et al., 2017). Los resultados obtenidos muestran un efecto negativo sobre el transporte de óvulos y embriones en la línea R tras ser tratada con rhFSH-CTP+hCG, sin observarse en la línea maternal A.

En la línea A, mediante los tratamientos con gonadotropinas como la pFSH, pFSH+rhLH (Mas et al., 2015) o rhFSH-CTP y rhFSH-CTP+LH (Viudes-de-Castro et al., 2017) se han obtenido valores similares de ERT a los controles y a este experimento (Tabla1) (alrededor de 80%). No obstante, se observa un descenso frente al control cuando se aplica los protocolos con la administración de rhFSH y rhFSH+rhLH (65-70%) (Herreros, 2014; Viudes-de-Castro et al., 2017).

El grupo control de la línea R, en cambio, presenta valores para este parámetro superiores a los obtenidos a los estudios previos (94.9% frente a 77-80%) (Vicente et al., 2003; Mehaisen et al., 2006). No obstante, cuando a esta línea se le aplica el tratamiento rhFSH-CTP +hCG se observa un descenso muy acusado ($94,9 \pm 4.37$ a $61,8 \pm 3.69$). Mehaisen et al. (2005) estudiando la respuesta superovulatoria en conejas múltiparas de esta línea obtuvo una tasa de recuperación para el grupo control y tratados con eCG en torno al 50% que descendía hasta el 28% cuando las conejas fueron tratadas con 200UI de eCG. En un estudio posterior con conejas nulíparas tanto en el grupo control como en el de conejas estimuladas con oFSH o eCG, la eficiencia recuperación se situó en torno al 77%-80% (Mehaisen et al. 2006), valores similares a las del presente trabajo para el grupo control y mejores que los obtenidos en las conejas estimuladas con rhFSH-CTP+hCG. No obstante, como ya se ha comentado anteriormente, la respuesta superovulatoria de estos trabajos fueron muy inferiores al obtenido con el tratamiento utilizado en este estudio, en Mehaisen et al. (2006) obtuvieron, en el mejor de los casos, una tasa de ovulación 25.2 para el tratamiento con oFSH.

4.1.4. Efecto sobre la obtención de embriones clasificados como normales atendiendo a criterios de morfología y cronología.

Como se ha comentado en el apartado anterior, no solo un perfil endocrino inadecuado inducido por el tratamiento podría alterar el transporte de gametos y embriones si no que puede tener efectos sobre los procesos de fecundación, incrementando el número de óvulos no fecundados, o sobre el desarrollo embrionario provocando alteraciones en el mismo que conducirán a embriones menos viables. Algunas de estas alteraciones pueden detectarse observando la morfología y cronología embrionaria. En general, la tasa de fecundación y las características morfológicas de normalidad embrionaria puede variar entre líneas, pero se encuentra por encima del 90% (Adams, 1960; Bolet y Theau-Clément, 1994; García et al., 2016). En el estudio actual, el índice de normalidad obtenido fue similar entre grupos de tratamiento y cercana al 90% pero, hubo diferencias significativas para la línea genética, situándose en un 83,4% para la línea R y en un 94,9% para línea A ($P < 0,05$, Tabla 1, Figura 9). La interacción tratamiento por línea y el factor tratamiento no resultaron significativos.

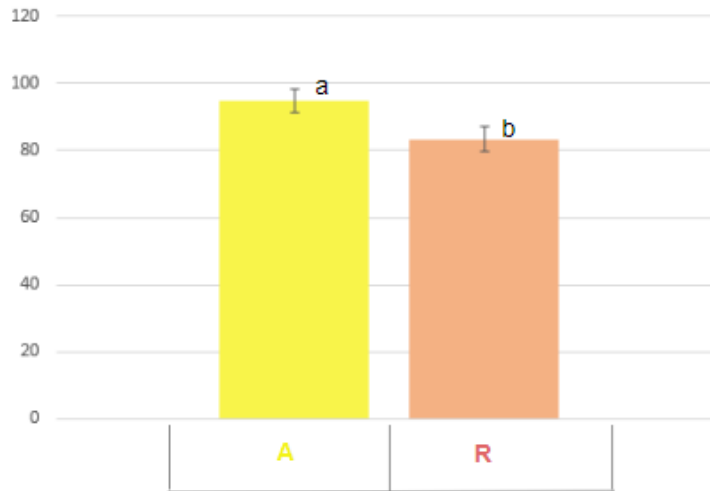


Figura 9. Índice de normalidad, porcentaje de embriones normales respecto al total de embriones. Valores con diferente superíndice en las columnas difieren estadísticamente ($P < 0,05$).

En la línea A se produjo un descenso de porcentaje de embriones normales después de aplicar la rhFSH-CTP+hCG, pero sin llegar a ser significativo (Tabla 1). Otros estudios han observado un descenso similar de embriones normales cuando se le aplica el tratamiento rhFSH-CTP a la línea A, de 91,2 a 81% en Fortea (2017) y de 99 a 91% en Viudes-de-Castro et al. (2017) o la rhFSH que provoca un descenso descende hasta 77% frente 99% del control.

La línea R en este experimento mantiene unos valores similares al control, concordando con experimentos anteriores realizados con esta línea. En Mehaisen et al. (2006) no encontraron diferencias significativas de este parámetro entre tratamientos (eCG y oFSH) y el grupo control. Además, los porcentajes reportados (81.1, 78.2 y 78.9% control, eCG y FSH, respectivamente) fueron similares a los obtenidos en este estudio (82.3% y 84.4% control y rhFSH-CTP, respectivamente).

En conejos, se ha estimado que las pérdidas desde la fecundación hasta la implantación son de alrededor de 10-14% (Adams,1959; Santacreu et al., 2000). Suponiendo que solo los embriones normales consiguieron desarrollarse, estos resultados se encuentran dentro de los parámetros normales con unas pérdidas de alrededor del 11% (Tabla 1), siendo de un 5% para la línea A y del 17% para la línea R.

Cuando se analizó, el número de embriones normales resultó ser significativo para los tres factores: tratamiento, la línea y su interacción (Figura 10,11 y 12). De tal forma que se consiguen más embriones de calidad aplicando el tratamiento (Figura 11), pero el efecto no es tan notorio para la línea R como lo es para la A. A pesar de que no se han observado en la respuesta a nivel del ovario siendo las tasas de ovulación similares, la línea R mostró una notable disminución del número de embriones normales o de excelente calidad morfológica (Figura 10). Es posible que el tratamiento en esta línea afecte al ambiente oviductal en el que tiene lugar los procesos de fecundación, segmentación y transporte de los embriones, dando lugar a una mayor cantidad de errores en su desarrollo (fallos de fecundación, retraso en la segmentación, etc). Estos efectos negativos de los tratamientos de superovulación sobre el desarrollo temprano del embrión y a su viabilidad tanto in vivo como in vitro han sido descritos por diversos autores (Greve et al., 1995; Ferreira et al., 2009; Viudes-de-Castro et al., 2017; Uysal et al., 2017)

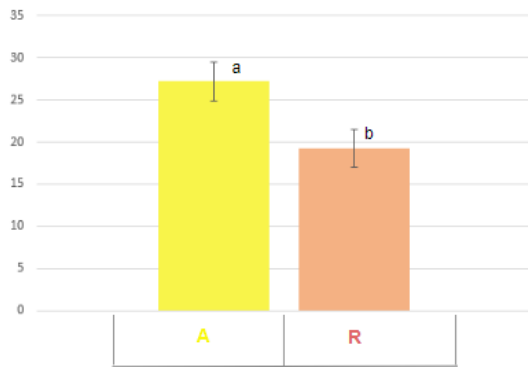


Figura 10. Número de embriones recuperados morfológicamente normales acorde con la línea.

Valores con diferente superíndice en las columnas difieren estadísticamente ($P < 0,05$).

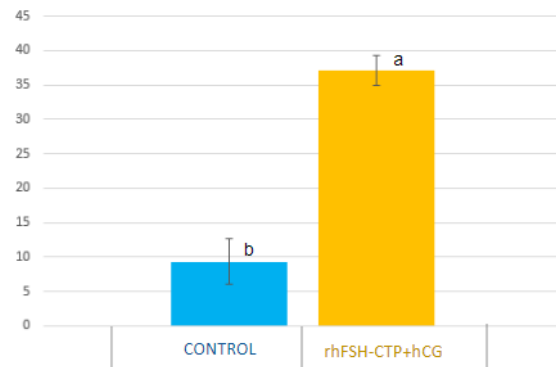


Figura 11. Número de embriones recuperados morfológicamente normales acorde con el tratamiento.

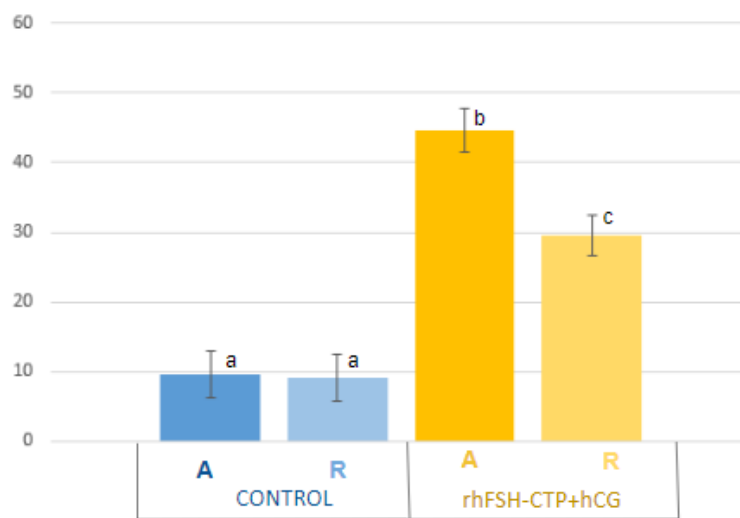


Figura 12. Número de embriones recuperados morfológicamente normales por tratamiento y línea.

Los valores obtenidos para las hembras tratadas de la línea A son similares a los obtenidos por Viudes-de-Castro et al. (2019) utilizando el mismo tratamiento que este estudio rhFSH-CTP+hCG (alrededor de 40). Además, el ensayo comentado reportó diferencias significativas con el número de embriones recogidos consiguiendo una eficacia más alta con el uso de la rhFSH-CTP+hCG frente a la rhFSH-CTP (41,4 vs 28.2).

En Mehaisen et al. (2005) no se encontraron diferencias significativas para el número de embriones normales recuperados del grupo control entre la línea maternal V y la R, siendo ambas alrededor de 7, pero entre los grupos de ambas líneas tratados con eCG para superovular, al igual que en este trabajo. A pesar de ello, el rendimiento en términos de embriones normales (excelente calidad morfológica) es satisfactorio, incluso para la línea R, si tenemos en cuenta que anteriores trabajos, Mehaisen et al. (2006) obtuvieron, en el mejor de los casos con el tratamiento con oFSH, 17,7 embriones con el primer tratamiento frente a los 29,6 obtenidos en este estudio.

4.2 Efecto de la estimulación ovárica con coriofolitropina alfa (rhFSH-CTP) y de línea genética sobre la viabilidad in vivo de los embriones catalogados como normales.

Se transfirieron los embriones catalogados como normales con respecto a los criterios de morfología y cronología descritos. Tras 12 días desde la inducción de la ovulación, 9 días post-transferencia, se observó mediante laparoscopia el número de embriones que habían implantado en el útero pudiendo establecer el porcentaje de viabilidad en relación con el número de embriones transferidos. De igual modo, tras el recuento de los gazapos nacidos pudo establecerse el porcentaje de viabilidad al parto en relación con los transferidos. En el análisis, se tuvo en cuenta el número de embriones transferidos incorporando este dato como covariable en el modelo de análisis, observando que ni el número de embriones implantados ni el de nacidos totales por coneja receptora fue afectado por tratamiento o la línea de origen de los embriones (Tabla 2). En términos porcentuales el 74,7% de los embriones transferidos se implantaron y desarrollaron estructuras fetales y un 62,2 % de los transferidos finalizaron su desarrollo a término. Resultados similares o mejores que los descritos para esta especie tanto para embriones obtenidos de conejas tratadas como control (López et al., 1993; Besenfelder y Brem, 1993; Salvetti et al., 2007; Fortea, 2017).

Para la línea A, Viudes-de-Castro et al. (2017) observaron unos porcentajes de implantación y nacimiento más elevados con embriones de conejas donantes control que en conejas donantes tratadas con rhFSH-CTP o rhFSH (81% vs 63% y 63%, 75% vs 53% y 43%, porcentajes de implantación y nacimiento, respectivamente). Mientras que el tratamiento de rhFSH-CTP obtuvo valores ligeramente superiores a los observados en el presente trabajo (86 y 66%, implantación y nacimiento respectivamente) y no diferentes estadísticamente del control. Estos resultados demuestraban el efecto favorable de la suplementación con LH sobre la calidad y viabilidad de los embriones. Los resultados obtenidos en el presente estudio podrían indicar que la suplementación con hCG a este tratamiento contribuye a la calidad y viabilidad de los embriones hasta el punto de producir embriones de la misma calidad y viabilidad que los controles.

Las pérdidas fetales a partir del número de embriones implantados y nacidos por coneja se situaron en un promedio del 17% y la mortalidad perinatal en un 5,4%, sin presentar diferencias significativas entre los grupos (Tabla 2). Los datos obtenidos de pérdidas fetales del grupo control son bastante más bajas que las reportadas por Vicente et al. (2012) en conejas con ciclos naturales (8% y 9% frente a 20 y 40%, línea A y R, respectivamente)

Mehaisen et al. (2006) en la línea R obtuvieron un porcentaje de nacimientos en relación con embrión transferido de entre el 37 y el 42% sin observar diferencias entre los embriones de conejas donantes tratadas con FSH, eCG y control. Resultados ligeramente inferiores a los obtenidos en el presente estudio, en el que el porcentaje de nacimientos se sitúa entre el 71,4% 69% de los controles y el 54% de los tratados.

Tabla 2. Número de conejas, embriones transferidos, implantados y nacidos, pérdidas fetales y pérdidas perinatales por grupo experimental.

| Factor | Nº | ETT | ETR (lsm±es) | IMP (lsm±es) | NT (lsm±es) | PF (%) (lsm±es) | PP (%) (lsm±es) |
|--------------------------|----|-----|-----------------|-----------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Tratamiento | | | | | | | |
| Control | 12 | 143 | 11,9 ± 0,54 | 9,6 ± 0,71 | 8,7± 0,84 | 8,6± 7,96 | 1,7± 4,29 |
| CTP | 24 | 287 | 11,9 ± 0,38 | 8,5 ± 0,50 | 6,7± 0,59 | 25,5± 5,63 | 9,1 3±,55 |
| Línea | | | | | | | |
| A | 18 | 218 | 12,0 ± 0,46 | 9,5± 0,61 | 8,1± 0,73 | 14,2± 6,89 | 0,4± 4,13 |
| R | 18 | 212 | 11,8 ± 0,46 | 8,7± 0,61 | 7,3± 0,73 | 19,9± 6,89 | 10,4 ± 4,20 |
| Tratamiento*línea | | | | | | | |
| Control*línea A | 6 | 71 | 11,8 ± 0,76 | 9,9 ± 1,00 | 9,1 ± 1,19 | 8,2 ± 11,3 | 0,0 ± 6,64 |
| rhFSH-CTP+hCG*línea A | 12 | 147 | 12,3 ± 0,54 | 9,0 ± 0,71 | 7,1 ± 0,84 | 20,2 ± 8,00 | 0,8 ± 4,91 |
| Control*línea R | 6 | 72 | 12,0 ± 0,76 | 9,3 ± 1,00 | 8,3 ± 1,18 | 9,0 ± 11,3 | 3,4 ± 6.64 |
| rhFSH-CTP+hCG*línea R | 12 | 140 | 11,7 ± 0,54 | 8,0 ± 0,71 | 6,4 ± 0,84 | 30,8 ± 8,00 | 17,5 ± 5,15 |
| Total | 36 | 430 | 11,9 ± 0,327 | 9,1 ± 0,43 | 7,7 ± 0,51 | 17,0 ± 4,87 | 5,4 ± 2,95 |

Nº: número de conejas receptoras de embriones. ETT: embriones transferidos por grupo experimental. ETR: embriones transferidos por coneja. IMP: número de embriones transferidos implantados a 12 días de gestación. NT: Número de gazapos nacidos por coneja transferida. PF: porcentaje de embriones implantados que no llegan a nacer. PP: porcentaje de nacidos que nacen muertos frente a nacidos totales.

lsm ±es: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± erros estándar

Valores con diferente superíndice en las columnas difieren estadísticamente (P<0,05).

Por otra parte, es necesario resaltar que la línea R suele presentar mayores pérdidas durante la gestación y al nacimiento que otras como la línea A siendo conjuntamente de hasta el 50% (Vicente et al., 2012). Hecho que puede observarse de nuevo en el presente trabajo, a pesar de no observar diferencias significativas. Las conejas tratadas de la línea R muestran valores preocupantes en los índices calculados de pérdidas fetales y perinatales (30,8 y 17,5%, tabla 2). Vicente et al. (2012) se reportaron niveles anómalos 17β -estradiol y progesterona durante la gestación, siendo la posible causa de las elevadas pérdidas prenatales de esta línea. Los niveles de este esteroide son importantes, ya que actúan sobre las células luteales para mantener constante la imprescindible secreción de progesterona durante la gestación (Mclean y Millerz, 1985).

En esta línea también se ha estudiado los niveles séricos en las conejas durante la gestación y la expresión de los genes IGF en útero y embrión. Los niveles obtenidos de IGF-I se mostraban sobreexpresados pudiendo ocasionar problemas metabólicos que provocaran dificultades con la disponibilidad de los esteroides. Cabe añadir que a pesar de que la expresión del gen IGF-II estuviera más elevado, la expresión de su receptor (IGF-IIR) era mucho más baja comparada con la línea A, tanto en embriones como endometrio. El IGF-II está relacionado con el desarrollo fetal y durante este se puede unir a los receptores de insulina. Además, su sobreexpresión está relacionada con un crecimiento excesivo fetal. El IGR-IIR es un receptor que se une únicamente a IGF-II pero sin capacidad de transducción y su unión con este receptor provoca la degradación de IGF-II (Massague y Czech, 1982; Kadakia y Josefson, 2016).

En cuanto a la línea A, Viudes-de Castro et al. (2017) reportó unas pérdidas gestacionales frente a los embriones transferidos que no llegaron a nacer similares a la de este estudio para el control (25%). Tampoco se observó diferencia con los resultados del tratamiento rhFSH-CTP frente a la rhFSH-CTP+hCG utilizada, con unas pérdidas del 40-45%. Otros tratamientos ofrecieron mejores resultados, como la rhFSH-CTP+LH con pérdidas del 34%. Sin embargo, los protocolos de FSH y FSH+LH ofrecieron peores resultados que los de rhFSH-CTP (alrededor de 55%).

Las pérdidas perinatales (Tabla 2) se calcularon como el número de nacidos vivos respecto a los totales. En cuanto a los controles, los datos concuerdan con los obtenidos en 2015 en la UPV (Pérez, 2015), donde las líneas maternas tenían una mortalidad perinatal de alrededor del 5 % (concretamente la A de alrededor del 6%) y en Argente et al. (1999) obtuvieron alrededor de un 8,4% con la línea V, también materna. En cuanto a la línea R control su mortalidad perinatal se encuentra alrededor de 5-10% (Lozano et al., 1988; Pérez, 2015). Estos datos son ligeramente más elevados que los obtenidos para la línea R control de 3,4%.

Vicente et al. (2012) reportó para la línea R un porcentaje de pérdidas perinatales del 15% mientras que para la A del 4%, valores ligeramente más elevados que los resultados obtenidos (Tabla 2).

A pesar de los problemas reproductivos descritos para la línea R y que el número de embriones de calidad recuperados es menor, la respuesta al tratamiento de superovulación permite obtener suficientes embriones de calidad para favorecer las labores de conservación y difusión de esta línea. Además, no se encontraron diferencias significativas en ningún parámetro posterior a la transferencia de embriones, de forma que es posible que al transferir solamente los embriones de excelente calidad morfológica a conejas núlparas se reduzcan o anulen parte de las deficiencias reproductivas asociadas a esta línea de crecimiento (R). El rendimiento final podría ser mejorado, ajustando la suplementación de hCG en el tratamiento y transfiriendo los embriones de ésta línea sobre una materna como la línea A con mejores características reproductivas que permitan reducir las pérdidas postimplantaciones y al parto.

La línea materna muestra una respuesta en cantidad, calidad y viabilidad de los embriones que no parece ser afectada por el tratamiento, al igual que en otros estudios

realizados con la misma hormona rhFSH-CTP suplementada con LH y hCG (Viude-de Castro et al., 2017 y 2019).

En general el modelo los resultados obtenidos aceptables, validando la rhFSH-CTP suplementada con hCG para ambas líneas.

5. **CONCLUSIONES**

5. CONCLUSIONES

Del análisis de resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que:

- ❖ La rhFSH-CTP+hCG desencadena una respuesta ovulatoria unas 4 veces superior a la normal y permite incrementar hasta por 4 el número de embriones morfológicamente normales.
- ❖ Los embriones obtenidos y catalogados como morfológicamente normales presentaron post-transferencia una viabilidad al nacimiento similar a los controles, lo que indicaría que la calidad de éstos no se vio afectada por el tratamiento con rhFSH-CTP+hCG.
- ❖ La línea R control presenta graves deficiencias en la obtención de embriones normales, empeoradas generalmente por el tratamiento rhFSH-CTP+hCG. Este efecto es minimizado o anulado cuando se transfieren los embriones.

6.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- ACEVEDO-RODRÍGUEZ, A.; KAUFFMAN, A. S.; CHERRINGTON, B. D.; BORGES, C. S.; ROEPKE, T. A.; LACONI, M. (2018). Emerging insights into hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation and interaction with stress signalling. *Journal of neuroendocrinology*, 30(10), e12590.
- ADAMS, C. E. (1959). Studies on prenatal mortality in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*: the amount and distribution of loss before and after implantation. *Journal of Endocrinology*, 19(4), 325-NP.
- ADAMS, C. E. (1960). Prenatal mortality in the rabbit *oryctolagus cuniculus*. *Reproduction*, 1(1), 36-44.
- ALARCÓN, C. E.; HURTADO, H.; CASTELLANOS, J. E. (2000). Anticuerpos aviares: alternativa en producción y diagnóstico. *Biomédica*, 20(4), 338-343.
- ALFONSO; M. A., ALMEIDA, G.; QUINTELA, A. M.; SIMÓN, R. (2001). Evaluación de un posible modelo experimental de aterosclerosis carotídea en conejos hipercolesterolémicos. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 20(3), 192-196.
- AL-INANY, H.; ABOULGHAR, M.; MANSOUR, R.; SEROUR, G. (2003). Meta-analysis of recombinant versus urinary-derived FSH: an update. *Human Reproduction*, 18(2), 305-313.
- ALVARIÑO, J. M. R.; REBOLLAR, P. G. (1995). Control de la reproducción, tratamientos hormonales. *Boletín de cunicultura*, (77), 43-46.
- ALVARIÑO, R. (1993). *Control de la reproducción en el conejo*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- ALVES, N.; GARAY, I; DEANA, N. F. (2016). Efectos del Láser de Baja Intensidad (As-Ga-Al 904 nm) sobre el Cóndilo Mandibular de Conejos: Análisis a través de Tomografía Computadorizada Cone Beam. *International Journal of Morphology*, 34(1), 218-222.
- AMANN, R. P. (1982). Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. *Fundamental and Applied Toxicology*, 2(1), 13-26.
- ARGENTE, M. J.; SANTACREU, M. A.; CLIMENT, A.; BLASCO, A. (1999). Phenotypic and genetic parameters of birth weight and weaning weight of rabbits born from unilaterally ovariectomized and intact does. *Livestock production science*, 57(2), 159-167.
- ARIAS, M.; GARCÍA, R. M.; REBOLLAR, P. G.; LORENZO, P. L. (2007). Desarrollo folicular en la coneja. *ITEA*, Vol. 103 (4), 173-185
- BAKER, T. G. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royal Society of London*, 158(972), 417-433.
- BAKKER, J.; BAUM, M. J. (2000). Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Frontiers in neuroendocrinology*, 21(3), 220-262.
- BALASUBRAMANIAN, P.; JAGANNATHAN, L.; SUBRAMANIAN, M.; GILBREATH, E. T., MOHANKUMAR, P. S.; MOHANKUMAR, S. M. J. (2012). High fat diet affects reproductive functions in female diet- induced obese and dietary resistant rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 24,748–755.
- BEHRE, H. M.; GREB, R. R.; MEMPEL, A.; SONNTAG, B.; KIESEL, L.; KALTWAER, P.; SELIGER, E.; RÖPKE, F.;GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E.; SIMONI, M. (2005). Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (Fsh) receptor gene for

the ovarian response to FSH: A pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation. *Pharmacogenetics and Genomics*, 15(7), 451–456.

BELAISCH-ALLART, J.; DE MOUZON, J.; LAPOUSTERLE, C.; MAYER, M. (1990). The effect of HCG supplementation after combined GnRH agonist/HMG treatment in an IVF programme. *Human Reproduction*, 5(2), 163-166.

BERMAN, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; MAMEN, M.; HERZ, Z.; WOLFENSON, D.; ARIELI, A.; GRABER, Y. (1985). Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical climate. *Journal of Dairy Science*, 68(6), 1488-1495.

BESENFELDER, U.; BREM, G. (1993). Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *Reproduction*, 99(1), 53-56.

BESENFELDER, U.; HAAS, C.; BREM, G. (2000). Reproduction technology and gene transfer in rabbits, en: *Proceedings of 7th world rabbit congress*, Valencia Spain. Vol a pp.37–59.

BOLET, G.; THEAU-CLÉMENT, M. (1994). Fertilisation rate and preimplantation embryonic development in two rabbit strains of different fecundity, in purebreeding and crossbreeding. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2), 153-162.

BOSCH, E.; DE VOS, M.; HUMAIDAN, P. (2020). The future of cryopreservation in assisted reproductive technologies. *Frontiers in Endocrinology*, 11

BOUDJENAH, R.; MOLINA-GOMES, D.; TORRE, A.; BERGERE, M.; BAILLY, M.; BOITRELLE, F.; TAIEB, S.; WAINER, R.; BENAHMED, M.; DE MAZANCOURT, P.; SELVA, J.; VIALARD, F. (2012). Genetic polymorphisms influence the ovarian response to rFSH stimulation in patients undergoing in vitro fertilization programs with ICSI. *PLoS ONE*, 7(6).

BOURKE, D. A.; KYLE, C. E.; MCEVOY, T. G.; YOUNG, P.; ADAM, C. L. (1995). Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology*, 44(2), 255-268.

BRIDGES, P. J.; BRUSIE, M. A.; FORTUNE, J. E. (2005). Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione, estradiol, and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Domestic animal endocrinology*, 29(3), 508-522.

BRINTON, L. A.; MOGHISSI, K. S.; SCOCCIA, B., WESTHOFF, C. L.; LAMB, E. J. (2005). Ovulation induction and cancer risk. *Fertility and sterility*, 83(2), 261-274.

CAMERO, G.; ESQUIVEL, D. F.; DE RODRÍGUEZ, S. C.; DE GÓMEZ, M. S. (1993). Aislamiento y purificación de hormona luteinizante humana: I-extracción a partir de hipófisis. *Revista Colombiana de Química*, 22(1), 69-78.

CARBALLO, M.E.; DURÁN, M.L.; CERVANTES, I. E. (2019). Técnicas de laboratorio de fertilización in vitro: avances y aplicaciones. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 17(S1), 27-33.

CARNEY, E. W.; FOOTE, R. H. (1990). Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos in vivo and in vitro. *Reproduction*, 89(2), 543-551.

CASTELLINI, C. (1996) Recientes avances en la inseminación artificial en conejos. *Cunicultura*, 21(123), 0272-284.

CASTELLINI, C.; DAL BOSCO, A.; ARIAS-ÁLVAREZ, M.; LORENZO, P. L.; CARDINALI, R.; REBOLLAR, P. G. (2010). The main factors affecting the reproductive performance of rabbit does: A review. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), 174–182.

CATALANO, P. N.; BONAVENTURA, M. M.; DI GIORGIO, N. P.; LIBERTUN, C.; LUX, V. A. R. (2009). Participación de los receptores GABA B en la regulación del eje gonadotrófico: evaluación en

- ratones GABAB1 (-/-). *Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*, 16(1), 57-71.
- CEDRIN-DURNERIN, I.; GRANGE-DUJARDIN, D.; LAFFY, A.; PARNEIX, I.; MASSIN, N.; GALEY, J.; THERON, L.; WOLF, J.P.; CONORD, C.; CLEMENT, P.; JAYOT, S.; HUGUES, J.N. (2004). Recombinant human LH supplementation during GnRH antagonist administration in IVF/ICSI cycles: a prospective randomized study. *Human Reproduction*, 19(9), 1979–1984.
- CHANNING, C. P.; HILLENSJO, T.; SCHAERF, F. W. (1978). Hormonal control of oocyte meiosis, ovulation and luteinization in mammals. *Clinics in endocrinology and metabolism*, 7(3), 601-624.
- CHRISTIAN, C. A.; MOENTER, S. M. (2010). The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocrine reviews*, 31(4), 544-577.
- CHU, T.; DUFORT, I.; SIRARD, M. A. (2012). Effect of ovarian stimulation on oocyte gene expression in cattle. *Theriogenology*, 77(9), 1928-1938.
- COCHIUS, J. I.; BURNS, R. J.; BLUMBERGS, P. C.; MACK, K.; ALDERMAN, C. P. (1990). Creutzfeldt-Jakob disease in a recipient of human pituitary-derived gonadotrophin. *Australian and New Zealand journal of medicine*, 20(4), 592-593.
- COOMARASAMY, A.; AFNAN, M.; CHEEMA, D.; VAN DER VEEN, F.; BOSSUYT, P. M.; VAN WELY, M. (2008). Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 23(2), 310-315.
- CORTELL, C.; SALVETTI, P.; JOLY, T.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. (2015). Effect of different superovulation stimulation protocols on adenosine triphosphate concentration in rabbit oocytes. *Zygote*, 23(4), 507-513.
- DE CASTRO, F.; RUIZ, R.; MONTORO, L.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, D.; PADILLA, E. S. C.; REAL, L. M.; RUIZ, A. (2003). Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertility and Sterility*, 80(3), 571-576.
- DE RENSIS, F.; LÓPEZ-GATIUS, F. (2014). Use of Equine Chorionic Gonadotropin to Control Reproduction of the Dairy Cow: A Review. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(2), 177–182.
- DE TURCKHEIM, M.; BERGER, M.; JEAN-FAUCHER, C.; VEYSSIERE, G.; JEAN, C. (1983). Changes in ovarian oestrogens and in plasma gonadotrophins in female rabbits from birth to adulthood. *European Journal of Endocrinology*, 103(1), 125-130.
- DUIJKERS, I. J.; KLIPPING, C.; BOERRIGTER, P. J.; MACHIELSEN, C. S.; DE BIE, J. J.; VOORTMAN, G. (2002). Single dose pharmacokinetics and effects on follicular growth and serum hormones of a long-acting recombinant FSH preparation (FSH-CTP) in healthy pituitary-suppressed females. *Human Reproduction*, 17(8), 1987-1993.
- ELBLING, L.; COLOT, M. (1985). Abnormal development and transport and increased sister-chromatid exchange in preimplantation embryos following superovulation in mice. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(4), 189-195.
- ELBLING, L.; COLOT, M. (1987). Persistence of SCE-inducing damage in mouse embryos and fetuses following superovulation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 176(1), 117-122.
- ELKOMY, A. E.; EL-SPEIY, M. E. (2015). Polyunsaturated fatty acids combined with equine chorionic gonadotropin to enhance reproductive performance in aged rabbit does. *Italian Journal of Animal Science*, 14(1), 3535.

- ERICKSON, B. H. (1966). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of animal science*, 25(3), 800-805.
- ERICKSON, B. H.; REYNOLDS, R. A.; MURPHREE, R. L. (1976). Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. *Biology of reproduction*, 15(4), 555-560.
- ERICKSON, G. F.; RYAN, K. J. (1975). The effect of LH/FSH, dibutyryl cyclic AMP, and prostaglandins on the production of estrogens by rabbit granulosa cells in vitro. *Endocrinology*, 97(1), 108-113
- ERICKSON, G. F.; RYAN, K. J. (1976). Stimulation of testosterone production in isolated rabbit thecal tissue by LH/FSH, dibutyryl cyclic AMP, PGF 2α , and PGE 2 . *Endocrinology*, 99(2), 452-458.
- ERTZEID, G.; STORENG, R. (1992). Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre-and postimplantation development in mice. *Reproduction*, 96(2), 649-655.
- ESCUADERO, L. E. (2012). Estimulación ovárica en reproducción asistida. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 58(3), 191-200.
- EZCURRA, D.; HUMAIDAN, P. (2014). A review of luteinising hormone and human chorionic gonadotropin when used in assisted reproductive technology. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 1-12.
- FARES, F. A.; SUGANUMA, N.; NISHIMORI, K.; LAPOLT, P. S.; HSUEH, A. J.; BOIME, I. (1992). Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin beta subunit to the follitropin beta subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(10), 4304-4308.
- FERNÁNDEZ, P. L.; MORENO, A.; LIZASOAIN, I.; LEZA, J.C.; MORO, M.A.; PORTOLÉS, A. (2015). *Velázquez. Farmacología Básica y Clínica*. Ed. Médica Panamericana S.A. Madrid.
- FERREIRA, E. M., VIREQUE, A. A., ADONA, P. R., MEIRELLES, F. V., FERRIANI, R. A., & NAVARRO, P. A. D. A. S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71(5), 836-848.
- FIRST, N. L.; BOSC, M. J. (1979). Proposed mechanisms controlling parturition and the induction of parturition in swine. *Journal of animal science*, 48(6), 1407-1421.
- FISCHER, B.; CHAVATTE-PALMER, P.; VIEBAHN, C.; NAVARRETE SANTOS, A.; DURANTHON, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144(1), 1-10.
- FORTEA, L. (2017). *Aplicación de Corifolitropina alfa en la producción de embriones de conejo (Oryctolagus cuniculus)*. Trabajo Fin de Grado en Biotecnología. Universitat Politècnica de València. 52 pp.
- FORTIER, A. L.; LOPES, F. L.; DARRICARRERE, N.; MARTEL, J.; TRASLER, J. M. (2008). Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta. *Human molecular genetics*, 17(11), 1653-1665.
- FUJIMOTO, S.; PAHLAVAN, N.; DUKELOW, W. R. (1974). Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. *Reproduction*, 40(1), 177-181.
- GARCÍA, D. A.; NICHOLLS, R. S.; ARÉVALO, A.; TORRES, O.; DUQUE, S. (2005). Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados en gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*. *Biomédica*, 25(4), 451-463.
- GARCÍA, M. L.; BLASCO, A.; ARGENTE, M. J. (2016). Embryologic changes in rabbit lines selected for litter size variability. *Theriogenology*, 86(5), 1247-1250.

- GARCIA-DOMÍNGUEZ, X.; MARCO-JIMENEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; VICENTE, J. S. (2019). Minimally invasive embryo transfer and embryo vitrification at the optimal embryo stage in rabbit model. *Journal of Visualized Experiments*, (147), e58055.
- GOODMAN, C.; ZAKIB, H.; FISCHELC, L.; GREISS, H.; COULAM, C. (2014). Are antimullerian hormone and its receptor genes associated with low ovarian response? *Journal of Genetic Disorders & Genetic Reports*, 3:1
- GOSSELIN, N.; PRICE, C. A.; ROY, R.; CARRIÈRE, P. D. (2000). Decreased LH pulsatility during initiation of gonadotropin superovulation treatment in the cow: Evidence for negative feedback other than estradiol and progesterone. *Theriogenology*, 54(4), 507–521.
- GREB, R. R.; BEHRE, H. M.; SIMONI, M. (2005). Pharmacogenetics in ovarian stimulation—current concepts and future options. *Reproductive BioMedicine Online*, 11(5), 589-600.
- GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P.; HØIER, R.; ASSEY, R. (1995). The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, 43(1), 41-50.
- GRIESINGER, G.; DIEDRICH, K.; DEVROEY, P.; KOLIBIANAKIS, E. M. (2006). GnRH agonist for triggering final oocyte maturation in the GnRH antagonist ovarian hyperstimulation protocol: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 12(2), 159-168.
- GUTHRIE, H. D.; PURSEL, V. G.; WALL, R. J. (1997). Porcine follicle-stimulating hormone treatment of gilts during an altrenogest-synchronized follicular phase: effects on follicle growth, hormone secretion, ovulation, and fertilization. *Journal of animal science*, 75(12), 3246-3254.
- HAFEZ, E. S. E. (1964). Seasonal fluctuations in ovulation rate and superovulatory response of the domestic rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*). *Acta Zoologica*, 45(1-2), 123-131.
- HANSEN, P. J. (2007). Effects of environment on bovine reproduction. *Current therapy in large animal theriogenology*, 431-442.
- HANSEN, P. J.; DROST, M.; RIVERA, R. M.; PAULA-LOPES, F. F.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER III, C. E.; CHASE JR, C. C. (2001). Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, 55(1), 91-103.
- HASLER, J. F.; BROOKE, G. P.; MCCAULEY, A. D. (1981). The relationship between age and response to superovulation in holstein cows and heifers. *Theriogenology*, 15(1), 109-109.
- HASLER, J. F.; MCCAULEY, A. D.; SCHERMERHORN, E. C.; FOOTE, R. H. (1983). Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19(1), 83-99.
- HAWK, H. W. (1988). Gamete transport in the superovulated cow. *Theriogenology*, 29(1), 125-142.
- HERREROS, A. (2014). *Efecto de las gonadotropinas recombinantes humanas rhFSH y rhLH sobre el desarrollo embrionario en conejo*. Trabajo Fin de Grado en Biotecnología. Univ. Politècnica de València.
- HERTZ, R.; HISAW, F. L. (1934). Effects of follicle-stimulating and luteinizing pituitary extracts on the ovaries of the infantile and juvenile rabbit. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 108(1), 1-13 .
- HESSER, M. W.; MORRIS, J. C.; GIBBONS, J. R. (2011). Advances in recombinant gonadotropin production for use in bovine superovulation. *Reproduction in domestic animals*, 46(5), 933-942.
- HSUEH, A. J.; ADASHI, E. Y.; JONES, P. B.; WELSH JR, T. H. (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrine reviews*, 5(1), 76-127.
- HUTT, K. J.; MCLAUGHLIN, E. A.; HOLLAND, M. K. (2006). Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell and tissue research*, 326(3), 809-822.

- INGRAM, D. L.; MANDL, A. M.; ZUCKERMAN, S. (1958). The influence of age on litter-size. *Journal of Endocrinology*, 17(3), 280-285.
- KADAKIA, R.; JOSEFSON, J. (2016). The relationship of insulin-like growth factor 2 to fetal growth and adiposity. *Hormone research in paediatrics*, 85(2), 75-82.
- KAGABU, S.; UMEZU, M. (2006). Variation with age in the numbers of ovulated ova and follicles of Wistar-Imamichi adult rats superovulated with eCG-hCG. *Experimental animals*, 55(1), 45-48.
- KANE, M.T.; FOOTE, R.H. (1970) Culture of 2- and 4-cell rabbit embryos to the expanding blastocyst stage in synthetic media. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 133(3), 921-925.
- KENNEDY, K. L.; FLOYD, A. A.; CLARKSON, A. M.; LEE, V. H. (2003). Epidermal growth factor regulation of connexin 43 in cultured granulosa cells from preantral rabbit follicles. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 64(1), 61-69.
- KENNELLY, J. J.; FOOTE, R. H. (1965). Superovulatory response of pre- and postpubertal rabbits to commercially available gonadotrophins. *Reproduction*, 9(2), 177-188.
- KLINGMÜLLER, D.; SCHEPKE, M.; ENZWEILER, C.; BIDLINGMAIER, F. (1993). Hormonal responses to the new potent GnRH antagonist Cetrorelix. *European Journal of Endocrinology*, 128(1), 15-18.
- LARSON, L. L.; SPILMAN, C. H.; DUNN, H. O.; FOOTE, R. H. (1973). Reproductive efficiency in aged female rabbits given supplemental progesterone and oestradiol. *Reproduction*, 33(1), 31-38.
- LE COTONNEC, J. Y.; PORCHET, H.; BELTRAMI, V.; MUNAFO, A. (1998). Clinical pharmacology of recombinant human luteinizing hormone: Part I. Pharmacokinetics after intravenous administration to healthy female volunteers and comparison with urinary human luteinizing hormone. *Fertility and sterility*, 69(2), 189-194.
- LEÃO, R. B. F.; ESTEVES, S. C. (2014). Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech. *Clinics*, 69(4), 279-293.
- LEBAS, F.; COUDERT, P.; DE ROCHAMBEAU, H. (1996). *El conejo: cría y patología*. Ed. FAO. Roma. 227pp.
- LEFÈVRE, B.; CAILLOL, M. (1978). Relationship of estrous behaviour with follicular growth and sex steroid concentration in the follicular fluid in the domestic rabbit, en: *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. EDP Sciences. Les Ulis (Vol. 18, No. 6, pp. 1435-1441).
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. (1999). Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology*, 51(2), 473-485.
- LERNER, S. P.; THAYNE, W. V.; BAKER, R. D.; HENSCHEN, T.; MEREDITH, S.; INSKEEP, E. K.; DAILEY, R. A.; LEWIS, P. E.; BUTCHER, R. L. (1986). Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in holstein cows. *Journal of Animal Science*, 63(1), 176-183.
- LI, L.; WANG, L.; LE, F.; LIU, X.; YU, P.; SHENG, J.; HUANG, H.; JIN, F. (2011). Evaluation of DNA methylation status at differentially methylated regions in IVF-conceived newborn twins. *Fertility and Sterility*, 95(6), 1975-1979
- LONDOÑO, J. M. P.; SUÁREZ, J. T.; CORONADO, S. M.; PÉREZ, N. I. C. (2011). Producción de anticuerpos policlonales IgG contra una proteína con actividad de óxido nítrico sintetasa de *Toxoplasma gondii* recombinante (NOS-Tg-r) y marcación inmunológica en taquizoítos. *Infectio*, 12(2).

- LÓPEZ, M.; FORCADA, F.; RODRÍGUEZ, J. A.; MARTÍN, M.; ZARAGAZA, L. (1993). Embryo recovery under anaesthesia after hCG or GnRH treatments in the rabbit and survival when a reduced number of embryos is transferred. *World Rabbit Science*, 1(4), 127-132.
- LOY, R. G.; HUGHES, J. P. (1966). The effects of human chorionic gonadotrophin on ovulation, length of estrus, and fertility in the mare. *The Cornell Veterinarian*, 56(1), 41.
- LOZANO, C. T.; REQUENA, F.; MAHÓ, J. L.; ALÓS, P. (1988). Evaluación de las mortalidades perinatales en el conejo de carne, en: *XIII Simposium de Cunicultura: Soria, 9 y 10 de junio 1988*. Asociación Española de Cunicultura (ASESCU). Soria, 199-210.
- LOZANO, J. M.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; O CALLAGHAN, D. (2003). Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction-Cambridge*, 125(4), 543-553.
- LUCIANO, A. A.; MAIER, D. B.; KOCH, E. I.; NULSEN, J. C.; WHITMAN, G. F. (1989). A comparative study of postoperative adhesions following laser surgery by laparoscopy versus laparotomy in the rabbit model. *Obstetrics and Gynecology*, 74(2), 220-224.
- LUCKETT, D. C.; MUKHERJEE, A. B. (1986). Embryonic characteristics in superovulated mouse strains: Comparative analyses of the incidence of chromosomal aberrations, morphological malformations, and mortality of embryos from two strains of superovulated mice. *Journal of Heredity*, 77(1), 39-42.
- LUNENFELD, B. (2011). Gonadotropin stimulation: past, present and future. *Reproductive medicine and biology*, 11(1), 11-25.
- MARCO, F.; VICENTE, J. S. (2012). *Bioteconología de la reproducción en especies ganaderas*. Ed. Universitat Politècnica de València. València.
- MARCO, F.; VICENTE, J. S.; LAVARA, R.; BALASCH S.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. (2010) Poor prediction value of sperm head morphometry for fertility and litter size in rabbit. *Repro Dom Anim*, 45: 118-123
- MARTÍN, M. (2016). Sincronización de celo y estimulación de la receptividad en las conejas. *Boletín de cunicultura lagomorpha*, (181), 42-47.
- MAS, A. (2015). *Efecto de la suplementación de rLH en la respuesta superovulatoria de conejas (Oryctolagus cuniculus) tratadas con pFSH*. Trabajo Fin de Grado en Biotecnología. Univ. Politècnica de València.
- MASSAGUE, J.; CZECH, M. P. (1982). The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 257(9), 5038-5045.
- MCLEAN, M. P.; MILLERZ, J. B. (1985). Steroidogenic effect of 17 β -estradiol on rabbit luteal cells in vitro: estrogen-induced maintenance of progesterone production. *Biology of reproduction*, 33(2), 459-469.
- MEHAISEN, G. M. K.; VICENTE, J. S.; LAVARA, R.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. (2005). Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. *Animal reproduction science*, 90(1-2), 175-184.
- MEHAISEN, G. M. K.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; VICENTE, J. S.; LAVARA, R. (2006). In vitro and in vivo viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology*, 65(7), 1279-1291.
- MOCÉ, E.; VICENTE, J. S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Animal Reproduction Science*, 110(1), 1-24.

- MONARI, S. (1987). Patología neonatal del conejo. *Cunicultura*, 12(65), 0011-13.
- MUÑOZ, E.; BOSCH, E.; FERNANDEZ, I.; PORTELA, S.; ORTIZ, G.; REMOHI, J.; PELLICER, A. (2012). The Role of LH in Ovarian Stimulation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(3), 409–416.
- MURPHY, B. D.; MAPLETOFT, R. J.; MANNS, J.; HUMPHREY, W. D. (1984). Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*, 21(1), 117-125.
- NAIK, B. R.; RAO, B. S.; VAGDEVI, R.; GNANPRAKASH, M.; AMARNATH, D.; RAO, V. H. (2005). Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (Ops) vitrification of rabbit embryos. *Animal Reproduction Science*, 86(3), 329-338.
- NATURIL-ALFONSO, C.; LAVARA, R.; MILLÁN, P.; REBOLLAR, P. G.; VICENTE, J. S.; MARCO-JIMÉNEZ, F. (2003). Study of failures in a rabbit line selected for growth rate. *World Rabbit Science*, 24(1), 47-53.
- NELISSEN, E. C.; DUMOULIN, J. C.; DAUNAY, A.; EVERS, J. L.; TOST, J.; VAN MONTFOORT, A. P. (2013). Placentas from pregnancies conceived by IVF/ICSI have a reduced DNA methylation level at the H19 and MEST differentially methylated regions. *Human Reproduction*, 28(4), 1117-1126.
- NICOSIA, S. V.; EVANGELISTA, I.; BATTA, S. K. (1975). Rabbit ovarian follicles. I. Isolation technique and characterization at different stages of development. *Biology of reproduction*, 13(4), 423-447.
- NOLAN, R.; O'CALLAGHAN, D.; DUBY, R. T.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P. (1998). The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology*, 50(8), 1263-1274.
- ORTEGA, S. P.; PURÓN, M. L. F.; ALBIOL, N. C.; SANTOLARIA, M. B. (2011). Retraso de la edad de la procreación e infertilidad. El recurso a la reproducción asistida y selección de embriones. El problema intergeneracional. *Cuadernos de Bioética*, 2(3), 325-340.
- OUT, H. J.; MANNAERTS, B. M.; DRIESSEN, S. G.; COELINGH BENNINK, H. J. (1995). A prospective, randomized, assessor-blind, multicentre study comparing recombinant and urinary follicle stimulating hormone (Puregon versus Metrodin) in in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, 10(10), 2534-2540.
- PALMA, G.A., (2008). *Biología de la Reproducción*. Ed. ReproBiotec. Córdoba. 693 pp
- PÉREZ, R. (2015). *Estudio de la supervivencia de los gazapos desde el nacimiento hasta el destete en varias líneas de selección en conejos*. Trabajo Fin de Grado en Biología. Univ. Politècnica de València.
- PETERS, H.; LEVY, E.; CRONE, M. (1965). Oogenesis in rabbits. *Journal of Experimental Zoology*, 158(2), 169-179.
- PHOOPHITPHONG, D.; SRISUWATANASAGUL, S.; TUMMARUK, P. (2017). Immunohistochemical localization of luteinizing hormone receptor in the cyclic gilt ovary. *Anatomia, histologia, embryologia*, 46(1), 94-100.
- PLATTEAU, P.; ANDERSEN, A. N.; LOFT, A.; SMITZ, J.; DANGLAS, P.; DEVROEY, P. (2008). Highly purified HMG versus recombinant FSH for ovarian stimulation in IVF cycles. *Reproductive medicine online*, 17(2), 190-198.
- PORRAS, J. C.; ZAMBRANO, C.; ECHEVERRI, D.; FONTANILLA, M. R. (2003). Aislamiento y caracterización de macrófagos-células espumosas a partir de aorta de un modelo de aterosclerosis en conejo hipercolesterolémico. *Biomédica*, 23(4), 476.

- QUINTELA, L. A., PEÑA, A. I., VEGA, M. D., GULLÓN, J., PRIETO, M. C., BARRIO, M., BECERRA, J.J.; MASEDA, F.; HERRADÓN, P. G. (2004). Ovulation induction in rabbit does submitted to artificial insemination by adding buserelin to the seminal dose. *Reproduction Nutrition Development*, 44(1), 79-88.
- RAJU, G. A. R.; CHAVAN, R.; DEENADAYAL, M.; GUNASHEELA, D.; GUTGUTIA, R.; HARIPRIYA, G.; GOVINDARAJAN, M.; PATEL, N. H.; PATKI, A. S. (2013). Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 6(4), 227-234.
- RALL, W. F. (1993). Advances in the cryopreservation of embryos and prospects for application to the conservation of salmonid fishes, en: *Genetic Conservation of Salmonid Fishes*. Springer-Verlag, Nueva York, 137-158 pp.
- RAO, C. V. (1979). Differential properties of human chorionic gonadotrophin and human luteinizing hormone binding to plasma membranes of bovine corpora lutea. *European Journal of Endocrinology*, 90(4), 696-710.
- REDONDO, P. G.; RODRÍGUEZ, F. P. C. (2007). Producción de conejos de aptitud cárnica, en: *Sistemas ganaderos en el siglo XXI*. Ed. Universidad de Sevilla. Sevilla, 443-461.
- REVELLI, A.; POSO, F.; GENNARELLI, G.; MOFFA, F.; GRASSI, G.; MASSOBRIO, M. (2006). Recombinant versus highly-purified, urinary follicle-stimulating hormone (r-FSH vs. HP-uFSH) in ovulation induction: a prospective, randomized study with cost-minimization analysis. *Reproductive biology and endocrinology*, 4(1), 38.
- RIVIERE, J. E.; PAPICH, M. G. (2018). *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 10ª Ed. John Wiley & Sons. Hoboken.
- ROA, J.; HERBISON, A. E. (2012). Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology*, 153(11), 5587-5599.
- RODRÍGUEZ, T. M. (2004). Introducción a la Ovulación. *Boletín de cunicultura lagomorpha*, (134), 51-54.
- ROLDÁN, E. R.; GARDE, J. J. (2004). Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción, en: *Los retos medioambientales del siglo XXI. La conservación de la Biodiversidad en España*. Ed. Fundación BBVA. Madrid, 307-338.
- ROUSTAN, A.; MAILLOT, D. (1991). Efecto de la inyección de GnRH (Receptal) sobre la fertilidad y la productividad numérica de conejas sometidas a cubrición natural. *Cunicultura*, 16(90), 0089-93.
- SÁ FILHO, M. F. D.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; GIMENES, L. U.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CASTRO, L.A.; PAULA, E.; SALES, J.N. S.; BARUSELLI, P. S. (2010). Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Animal Reproduction Science*, 118(2-4), 182-187.
- SALVETTI, P.; THEAU-CLÉMENT, M.; BECKERS, J. F.; HURTAUD, J.; GUÉRIN, P.; NETO, V.; FALIÈRES, J.; JOLY, T. (2007). Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. *Theriogenology*, 67(6), 1185-1193.
- SAM, A. H.; DHILLO, W. S. (2010). Endocrine links between fat and reproduction. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 12(4), 231-236.
- SÁNCHEZ, A. E.; SILVA, M. E. (2003). Evaluación de respuesta ovárica y calidad de ovocitos en gatas tratadas con hormona folículo estimulante (FSH) utilizando dos esquemas de administración. *Archivos de medicina veterinaria*, 35(1), 119-126.

- SANTACREU, M. A.; ARGENTE, M. J.; MOCÉ, M. L.; BLASCO, A. (2000). Selection for uterine capacity. II Response to selection estimated with a cryopreserved control population, en: *Proc. 7th World Rabbit Congress*. Valencia, Spain, 491 (Vol. 495).
- SAWYER, R.H.; SMITH, P.; HEATH, A. D.; JUENGEL, J.L.; WAKEFIELD, J.; MCNATTY, K.P., (2002). Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction*, 66(4), 1134-1150.
- SCHENCKE, C.; DEL SOL, M.; ROJAS, M. (2004). Relación útero-embriónica y su variación morfológica durante el período implantacional en conejo. *International Journal of Morphology*, 22(4), 313-322.
- SHI, W.; HAAF, T. (2002). Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 63(3), 329-334.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1), 126-136.
- SOHRABI, M.; ROUSHANDEH, A. M.; ALIZADEH, Z.; VAHIDINIA, A.; VAHABIAN, M.; HOSSEINI, M. (2015). Effect of a high fat diet on ovary morphology, in vitro development, in vitro fertilisation rate and oocyte quality in mice. *Singapore medical journal*, 56(10), 573.
- SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A.; SILVA, F. F.; ARAÚJO, R.; BÓ, G. A.; WILTBANK, M. C.; BARUSELLI, P. S. (2009). Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology*, 72(1), 10-21.
- SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. (1996). Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *Reproduction*, 108(1), 101-106.
- STATISTA RESEARCH DEPARTMENT. *Conejo: Producción española por CC. AA. 2018*. (s. f.). Statista. Recuperado el 14 de junio de 2020. <https://es.statista.com/estadisticas/526124/cabana-espanola-de-conejo-por-cc-aa-en-espana/>
- STEWART, F.; ALLEN, W. R. (1981). Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. *Reproduction*, 62(2), 527-536.
- SUMAR, J. (1993). Efectos de los estímulos de inducción en la ovulación de alpacas y llamas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 6(1), 17-21
- TALBERT, G. B. (1978). Effect of aging of the ovaries and female gametes on reproductive capacity. *The Aging Reproductive System*, 59.
- TARLATZIS, B. C.; FAUSER, B. C.; KOLIBIANAKIS, E. M.; DIEDRICH, K.; DEVROEY, P.; BRUSSELS GNRH ANTAGONIST CONSENSUS WORKSHOP GROUP. (2006). GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Human Reproduction Update*, 12(4), 333-340.
- TARLATZIS, B. C.; PADOS, G.; BONTIS, J.; LAGOS, S.; GRIMBIZIS, G.; SPANOS, E.; MANTALENAKIS, S. (1993). Ovarian stimulation with buserelin/HMG/HCG: prospective randomized study of short versus long protocol. *Human Reproduction*, 8(6), 807-812.
- TARLATZIS, B. C.; ZEPHIRIDIS, L. (2003). Perimenopausal conception. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 997(1), 93-104.
- TENA-SEMPERE, M. (2009). Neuroendocrinología de la reproducción: The kisspeptin age. *Endocrinología y Nutrición*, 56(3), 103-105.
- TIWARI-PANDEY, R.; RAM, M. (2009). Modulation of ovarian structure and abdominal obesity in curcumin-and flutamide-treated aging FSH-R haploinsufficient mice. *Reproductive Sciences*, 16(6), 539-550.

- UYSAL, F.; OZTURK, S.; AKKOYUNLU, G. (2017). Superovulation alters DNA methyltransferase protein expression in mouse oocytes and early embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(3) 503-513.
- VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; BECKERS, J. F. (1997). In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. *Theriogenology*, 47(1), 73-82.
- VEGETTI, W.; ALAGNA, F. (2006). FSH and folliculogenesis: from physiology to ovarian stimulation. *Reproductive biomedicine online*, 12(6), 684-694.
- VELÁZQUEZ, J.V.; MENDIETA, E. (2005) Factores que regulan el desarrollo folicular II: folículos antrales. *Encuentros en la Biología*, (101), 2.
- VICENTE, J. S.; LLOBAT, L.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; LAVARA, R.; BASELGA, M.; MARCO-JIMÉNEZ, F. (2012). Gestational losses in a rabbit line selected for growth rate. *Theriogenology*, 77(1), 81-88.
- VICENTE, J. S.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; DE LA LUZ GARCÍA, M.; BASELGA, M. (2003). Effect of rabbit line on a program of cryopreserved embryos by vitrification. *Reproduction Nutrition Development*, 43(2), 137-143.
- VICENTE, J.S.; LAVARA, R.; MARCO, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2011). Detrimental effect on availability of buserelin acetate administrated in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76(6):1120--1125.
- VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; CEDANO-CASTRO, J. I.; VICENTE, J. S. (2017). Effect of corifollitropin alfa supplemented with or without LH on ovarian stimulation and embryo viability in rabbit. *Theriogenology*, 98, 68–74.
- VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; MÁ S PELLICER, A.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, X.; TALAVÁN, A. M.; VICENTE, J. S. (2019). A single injection of corifollitropin alfa supplemented with human chorionic gonadotropin increases follicular recruitment and transferable embryos in the rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 696-701.
- VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; POMARES, A.; RIBES, M. S. D. J.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; VICENTE, J. S. (2015). Effect of luteinizing hormone on rabbit ovarian superstimulation and embryo developmental potential. *Theriogenology*, 84(3), 446-451.
- VIUDES-DE-CASTRO, M. V.; CORTELL, C.; MOCE, E., MARCO-JIMÉNEZ, F.; JOLY, T.; VICENTE, J. S. (2009). Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments. *Theriogenology*, 72(5), 655-662.
- WANG, Y.; OCK, S. A.; CHIAN, R. C. (2006). Effect of gonadotrophin stimulation on mouse oocyte quality and subsequent embryonic development in vitro. *Reproductive biomedicine online*, 12(3), 304-314
- WELLS, K.; O'HARA, R. B.; COOKE, B. D.; MUTZE, G. J., PROWSE, T. A., FORDHAM, D. A. (2016). Environmental effects and individual body condition drive seasonal fecundity of rabbits: identifying acute and lagged processes. *Oecologia*, 181(3), 853-864.
- WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. (2000). Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal reproduction science*, 60, 535-547.
- YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M. P. (1999). Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology*, 51(7), 1259-1266.
- YU, C.; JI, S. Y.; SHA, Q. Q.; DANG, Y.; ZHOU, J. J.; ZHANG, Y. L.; LIU, L; WANG, Z. W; HU, B; SUN, Q. Y; SUN, S. C; TANG, F; FAN, H. Y. (2016). BTG4 is a meiotic cell cycle-coupled maternal-zygotic-transition licensing factor in oocytes. *Nature structural & molecular biology*, 23(5), 387-394.

ZHANG, M. L., LU, S.; ZHENG, S. S. (2008). Epigenetic changes of pituitary tumor-derived transforming gene 1 in pancreatic cancer. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT*, 7(3), 313-317.