

EFFECTOS TRANSGENERACIONALES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE UNA LÍNEA PATERNAL DE CONEJOS RECONSTITUIDA A PARTIR DE EMBRIONES VITRIFICADOS

Juarez, J.D.¹, Marco-Jiménez, F.¹ y Vicente, J.S.¹

¹Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia
jvicent@dca.upv.es

INTRODUCCIÓN

Cada vez son más frecuentes los estudios que demuestran que la manipulación *in vitro* tanto de óvulos como de embriones, ya sea para su maduración, cultivo, microinseminación (ICSI), transferencia nuclear o crioconservación, ocasiona perturbaciones en el número de células y en la expresión génica durante el desarrollo pre-implantatorio con consecuencias sobre el desarrollo fetal y postnatal (Willadsen et al., 1991, McEvoy et al., 1998, Van Wagtenonk-de Leeuw et al., 2000, Kwong et al., 2000, Ecker et al., 2004, Corcoran et al., 2007, Mashoudi et al., 2007, Succu et al., 2008, Rizos et al., 2008, Saenz de Juano et al., 2012). Hasta la fecha, diversos estudios han demostrado que el proceso de crioconservación *per se*, o bien las técnicas asociadas (exposición a crioprotectores, cultivo embrionario, etc.) pueden modificar la expresión genética de los embriones a nivel de su desarrollo (Oct4, Katko et al., 2006, Succu et al., 2008), metabolismo (Na/K⁺ ATPasa, Succu et al. 2008) o sistemas de defensa contra el efecto de los radicales libres (GPX, Mamo et al., 2006; p53, Dhali et al., 2007). Los trabajos realizados por nuestro grupo en los últimos años indican que las técnicas de crioconservación y transferencia embrionaria tienen un efecto sobre el fenotipo de los animales. Concretamente, los individuos nacidos de embriones vitrificados difieren en su peso durante la etapa de lactación (semanas 1 a 4), velocidades de crecimiento, un distinto grado de madurez y diferencias en el peso de algunos de sus órganos como por ejemplo el hígado en relación con una población control no crioconservada (Lavara et al., 2015). Estas modificaciones parecen estar inducidas durante el re-establecimiento de la población, ya que se ha demostrado que la crioconservación embrionaria induce cambios en la función de la placenta, alterando rutas lipolíticas y lipogénicas y del proteoma hepático de los fetos también a nivel lipolítico (Sáenz-de-Juno et al., 2015 y 2016). El objetivo de estudio fue evaluar si la crioconservación y posterior transferencia de los embriones de una línea seleccionada por ganancia media diaria de peso entre el destete y el sacrificio (28 a 63 días) puede tener un efecto a largo plazo sobre el parámetro de selección.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron conejos pertenecientes a la línea sintética R, que ha sido seleccionada durante 38 generaciones por selección individual de la ganancia media diaria de peso entre los 28 y los 63 días de edad (Estany et al., 1992). En 2015 se recuperaron y vitrificaron 272 embriones pertenecientes a 30 conejas y 18 orígenes machos de la generación 36 que fueron posteriormente transferidos sobre 26 conejas receptoras de una línea de origen neozelandés blanco (Línea A, Estany et al., 1989). La vitrificación y transferencia se llevaron a cabo según los procedimientos descritos por Vicente et al. (2013). Un total de 55 gazapos pertenecientes a 18 conejas donantes y 15 orígenes machos alcanzaron la edad de 63 días. Tanto la población reconstituida de la generación 36 (RV36), así como animales coetáneos sin crioconservar de la generación 36 (R36) fueron seleccionados y reproducidos en las mismas instalaciones y según los criterios establecidos para la línea R durante 2 generaciones (37 y 38). Un total de 2448 conejos fueron pesados e identificados el día 28 y pesados nuevamente el día 63. El efecto del proceso de reconstitución de la población (recuperación, vitrificación y transferencia) sobre el peso a 28 y 63 días y, la ganancia media diaria de peso en este periodo fue analizado mediante un modelo lineal general que incluyó como factores fijos la generación-tipo de población (R36 y RV36, R37y RV37, R38 y

RV38). En el análisis del peso al destete, además, se incorporó al modelo como efecto aleatorio el tamaño de camada común y en el análisis del peso al sacrificio, la covariable peso a 28 días. Los análisis se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS 16.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los pesos y la ganancia media diaria de peso de las poblaciones y generaciones estudiadas se muestran en la tabla 1. Los resultados demuestran que la reconstitución de la población a partir de embriones vitrificados y transferidos sobre conejas maternas (RV36) provocó una disminución significativa del peso a 28 días (tabla 2) reduciendo este en torno al 20% de la población R36. Sin embargo, el peso a 28 días en las dos siguientes generaciones fue el mismo para las poblaciones RV37 y R37 y, RV38 y R38. La transferencia de los embriones vitrificados en un línea maternal provocó un efecto inesperado sobre el crecimiento durante el periodo de lactación y contrario a los resultados de Lavara et al. (2015) que observaron un efecto favorable sobre el crecimiento en este periodo cuando los embriones de la línea R nacían y eran amantados en receptoras de otra línea maternal (línea V). No obstante, este mayor peso al destete no conllevaba una velocidad de crecimiento igual a la población control no cricoconservada, por lo que el peso a las 20 semanas de edad fue ligeramente inferior. Los resultados del presente estudio no muestran diferencias para el peso a 63 días y para la ganancia media diaria en la generación 36. Sin embargo, sí se obtuvieron diferencias en ambos parámetros en las dos generaciones siguientes, en las que pudo observarse que las generaciones obtenidas de la población reconstituida (RV37 y RV38) presentaron significativamente menores pesos a 63 días y ganancias media diaria (tabla 2). Esto podría sugerir que los diferentes factores asociados al programa de vitrificación (recuperación, vitrificación, transferencia e incluso el origen de la receptora) podrían determinar el establecimiento de una subpoblación con modificaciones fenotípicas que pueden observarse incluso dos generaciones después. Estos cambios podrían estar relacionados con la modificación de la expresión génica del metabolismo lipídico de la placenta e hígado fetales observados durante el desarrollo (Vicente et al., 2013; Sáenz-de-Juno et al., 2015 y 2016). Cabe reseñar que Lavara et al. (2014) demostraron un efecto transgeneracional para el tamaño de camada en una población reconstituida de una línea maternal. En conclusión: la población reconstituida con el fin de disponer de una población que permita evaluar el proceso de selección por ganancia media diaria mostró un menor peso a 63 días y ganancia diaria en las dos generaciones posteriores a su constitución. Por lo que podría no ser adecuada la constitución de estas poblaciones para este fin.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Corcoran D et al., 2007. *Mol Repr Dev* 74:972-977.
- Dhali A., et al., 2007. *Theriogenology* 68:1292-1298.
- Ecker DJ et al., 2004. *Proc Natl Acad Sci USA* 101,1595–1600.
- Estany J et al., 1989. *Livest Prod Sci* 21:67-76.
- Estany J et al., 1992. *Genet Sel Evol* 24:527-537.
- Katkov II et al., 2006. *Cryobiology* 53:194-205.
- Kwong WY et al., 2000. *Development* 127:4195–202.
- Lavara R et al., 2014. *Theriogenology* 81: 988-992.
- Lavara R et al., 2015. *Theriogenology* 84:674-80.
- Mahsoudi B et al., 2007. *Biol. Reprod* 77:889–896.
- Mamo S et al., 2006. *Mol Repr Dev* 73:1380-1392.
- McEvoy TG et al., 1998. *Reprod Fertl Dev* 10, 459–464.
- Rizos D et al., 2008. *Reprod. Dom. Animal* 43: 44-50.
- Saenz-de-Juano MD et al. 2012. *Biol Reprod* 87:1-9.
- Saenz-de-Juano MD et al., 2014. *Reproduction* 147:789-801.
- Saenz-de-Juano MD et al., 2015. *PLoS One* 10:e0125157.
- Succu S et al., 2008. *Mol Repr Dev* 75:538-546.
- Van Wagtendonk-de Leeuw AM et al., 2000. *Theriogenology* 53,575–597.
- Vicente JS et al., 2013. *Cryobiology* 67: 321–326.
- Willadsen SM et al., 1991. *Theriogenology* 35, 161–70.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2014-53405-2-1-P del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Tabla 1. Valores medios de peso a 28 y 63 días y, ganancia media diaria de las generaciones 36, 37 y 38 de la población reconstituida mediante crioconservación de embriones y la población control.

Población	Generación	N	Peso a 28 días (g)	Peso a 63 días (kg)	GMD
Control (R)	36	452	775 ± 8,1	2,35 ± 0,013	44,9 ± 0,27
	37	637	779 ± 6,6	2,55 ± 0,011	50,5 ± 0,22
	38	619	712 ± 7,2	2,37 ± 0,012	47,4 ± 0,23
Vitrificada (RV)	36	55	642 ± 18,4	2,17 ± 0,033	43,6 ± 0,73
	37	211	732 ± 11,1	2,39 ± 0,021	47,4 ± 0,40
	38	474	705 ± 8,3	2,25 ± 0,014	44,2 ± 0,26

Datos expresados como media ± error estándar. N: número de gazapos. GMD: Ganancia media diaria de peso

Tabla 2. Contraste entre de las generaciones de la población reconstituida mediante crioconservación de embriones (RV) y la población control (R).

Parámetro	RV36-R36	RV37-R37	RV38-R38
Peso a 28 días (g)	-147 ± 49*	-52 ± 33	-24 ± 27
Peso a 63 días (kg)	-0,037 ± 0,042	-0,092 ± 0,015*	-0,113 ± 0,035*
GMD (g/día)	-1,34 ± 0,078	-3,11 ± 0,444*	-2,40 ± 0,336*

Medias ajustadas ± error estándar. GMD: Ganancia media diaria de peso

*Diferencia significativa (P<0,05).

TRANSGENERATIONAL EFFECTS ON GROWTH CHARACTERISTICS OF A PATERNAL RABBIT LINE RECONSTITUTED FROM VITRIFIED EMBRYOS

ABSTRACT: The objective of the study was to evaluate whether the cryopreservation and subsequent transfer of embryos from a selected line by daily mean weight gain between weaning and slaughter (28 to 63 days) may have a long-term effect on the selection parameter. Rabbits belonging to the synthetic line R, which has been selected for 38 generations by individual selection of the average daily gain of weight between 28 and 63 days of age were used. In 2015, 272 embryos belonging to 30 rabbits and 18 male from 36th generation were recovered and vitrified and then transferred to 26 recipient rabbits from a white New Zealand line. The reconstituted population of generation 36 (RV36), as well as contemporary animals without cryopreservation of generation 36 (R36) were selected and reproduced in the same facilities and according to the criteria established for line R for 2 generations (37 and 38). A total of 2448 rabbits were weighed and identified on day 28 and weighed on day 63. The results showed that the reconstitution of the population from vitrified embryos and transferred to maternal rabbits (RV36) caused a significant decrease in weight at 28 days, reducing this by around 20% of the population R36. Non differences were observed for weight at 63 day and daily weight gain in generation 36. However, differences were obtained in both parameters in the following two generations, in which it could be observed that the generations obtained from the reconstituted population (RV37 and RV38) had significantly lower weights at 63 days and daily weight gain. This could suggest that the different factors associated with the vitrification program (recovery, vitrification, transfer and even the origin of the recipient doe) could determine the establishment of a subpopulation with phenotypic modifications that can be observed even two generations later.

Keywords: vitrification, transgeneration, growth, rabbit.