

# Reproducción

## ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS E HISTOLÓGICAS OVÁRICAS DE CONEJAS SINCRONIZADAS.

### Preliminary immunohistochemical and histological studies in ovaries of synchronized rabbit does.

**Lorenzo P.L.\***, **Bonanno A<sup>1</sup>.**, **Arias-Álvarez M.**, **López-Béjar M.<sup>2</sup>** y **Rebollar P.G.<sup>3</sup>**

\*Departamento de Fisiología (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

<sup>1</sup> Departamento Dipartimento S.EN.FI.MI.ZO., sezione di Produzioni Animali, Facoltà di Agraria, Università di Palermo, Italia.

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad y Anatomía Animales. Universidad Autónoma de Barcelona.

<sup>3</sup> Departamento de Producción Animal. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.

Corresponding author. Tel.: 91-549 1880; E-mail Address: pilar.grebollar@upm.es

#### RESUMEN

En las conejas lactantes es necesario aplicar tratamientos de estimulación del celo para obtener resultados satisfactorios de fertilidad. En este trabajo hemos querido determinar el efecto de diferentes técnicas de sincronización de celo sobre algunas características morfológicas ováricas. Un total de 20 conejas multíparas lactantes se distribuyeron al azar en tres grupos: BIO (cierre del nido en día 9, lactación controlada el día 10 y 11; n=10), PMSG (20 UI de PMSG el día 9 post-parto; n=5) y CONTROL (ningún tratamiento; n=5). Los ovarios de todas las conejas se extirparon el día 11 post-parto. En ellos se valoraron sus características morfométricas (peso, anchura y longitud) y se realizaron estudios histológicos y de inmunohistoquímica con el objeto de detectar la presencia del receptor de la Hormona del Crecimiento (GHR). Los tratamientos de sincronización no afectaron a las características morfológicas del ovario, pero se observó que las conejas tratadas con PMSG presentaron una proporción ligeramente inferior de folículos primarios al del grupo BIO y similar al del grupo CONTROL (25,7%, 58,9% y 42,3%, respectivamente; P=0,1). La presencia de GHR en el tejido ovárico fue más evidente en las conejas tratadas con PMSG y en las separadas de su camada, mostrándose más marcada la intensidad del marcaje en los folículos primordiales y en los propios oocitos, demostrando la presencia y el papel estimulador de esta hormona en el desarrollo folicular descrito también en otras especies. Estos estudios muestran algunas características ováricas de conejas lactantes sincronizadas y abren nuevas vías para el estudio de los mecanismos intra-ováricos que pueden estar incidiendo sobre el desarrollo folicular de conejas en post-parto.

#### ABSTRACT

The use of synchronization methods is necessary when artificial insemination (A.I.) is applied in lactating rabbit does in order to obtain high fertility results. The present study was undertaken to

investigate the effect of PMSG treatment and the doe-litter separation method to synchronize oestrus in rabbit does in some ovarian morphological parameters. A total of 20 lactating multiparous does were distributed in three experimental groups: BIO (closing of nest box on day 9, controlled nursing on day 10 and 11, n=10), PMSG (20 UI administered on day 9 post-partum; n=5) and CONTROL (without treatment; n=5). Ovaries were obtained on day 11 post-partum in order to check the morphometric status (weight, width and height), and to make histological and immunohistochemical studies to show the presence of Growth Hormone Receptor (GHR). As a result, synchronization methods not shown any significant difference in relation to CONTROL group. However, a light decrease in the number of primary follicles were evidenced in PMSG group with respect to Bio group and similar to control group (25,7%, 58,9% y 42,3%, respectively; P=0,1). GHR immunostaining–presence was more evident in BIO and PMSG groups, including primordial follicles and oocyte itself. Thus, it would be possible some direct effects of GH on follicular development described in other species. The present studies show some ovarian parameters from lactating synchronized rabbit does and open new ways to study some intra-ovarian mechanism of follicular development in the post-partum period of rabbit does.

Key words: rabbit doe, follicles, ovary, synchronization.

## ■ INTRODUCCIÓN

Para conseguir buenos resultados de fertilidad aplicando ritmos de cubrición semi-intensivos es necesaria la estimulación ovárica de las conejas, ya que la lactación reduce en gran medida la receptividad sexual (Ubilla y Rebollar, 1995). Bonanno et al., 1990, demostraron que dosis crecientes de PMSG (0, 10, 15, 20 UI) en una inyección intramuscular provocan crecimientos foliculares ováricos proporcionales a la dosis que se inyecta (7,8, 9,8, 12,8 y 11,1 folículos antrales) y otros autores (Maertens et al., 1998 y Rebollar et al., 2005) han demostrado que aumenta la fertilidad en las conejas multiparas lactantes inseminadas en sus primeras lactaciones. Por otro lado, las separaciones transitorias de camada antes de la inseminación provocan una disminución de prolactina (PRL), mejorando la actividad esteroidogénica ovárica (Ubilla et al., 2000). El incremento en los niveles de estradiol observado en conejas sincronizadas (Rebollar et al., 2005) se podría asociar a un mayor desarrollo folicular, pero éste no ha sido cuantificado. En cerdas, se ha descrito la presencia de folículos de pequeño y medio tamaño en todos los días del ciclo estral, sin embargo los de gran tamaño sólo aparecen en días próximos al estro (Kelly et al., 1988).

Así como la PRL deprime la actividad ovárica afectando a la receptividad sexual, a la hormona del crecimiento (GH), que también es una hormona adenohipofisaria, se le atribuyen en otras especies favorecedores efectos en la evolución y desarrollo de los folículos ováricos, así como sobre la maduración de los oocitos que se encuentran en su interior (Fortune et al., 2003). En ratones se ha demostrado que la alteración del gen codificador del receptor y de la proteína transportadora de GH provoca, entre otros déficits, un menor número de folículos preovulatorios y una menor tasa de ovulación (Zackek et al., 2002), tanto si ésta es inducida como si es espontánea (Bachelot et al., 2002). La distribución de estos receptores en las diferentes capas y estadios de desarrollo folicular se ha estudiado en ovarios de vaca y oveja (Eckery et al., 1997; Kölle et al., 1998), pero en la coneja no se han descrito.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la distribución de las poblaciones foliculares y la inmunolocalización de receptores a la GH en el tejido ovárico de conejas lactantes sincronizadas con PMSG o mediante separación transitoria de la camada, para intentar explicar las mejoras de receptividad y fertilidad debidas a la aplicación de tratamientos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

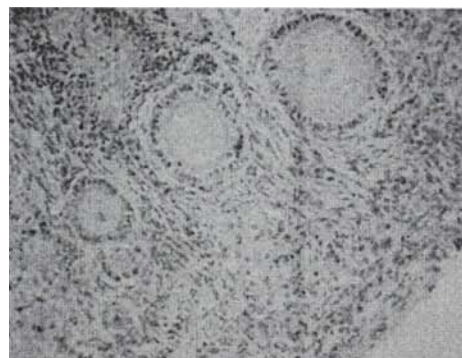
Se emplearon 20 conejas de raza blanca de Nueva Zelanda x California, múltiparas lactantes, con un tamaño ajustado de 8 gazapos por camada, con menos de 5 partos, con un peso medio de  $4,180 \pm 0,393$  kg, alojadas en una explotación comercial colaboradora de la Universidad de Palermo (Italia). Para la sincronización del estro las conejas se distribuyeron en 3 grupos: grupo BIO, con cierre del nido el día 9 post-parto y posterior lactación controlada el día 10 y 11 post-parto (n=10), grupo PMSG tratadas con 20 UI de esta gonadotropina (Foligón, Lab. Intervet) 48 horas antes del sacrificio (n=5) y un grupo control que no recibió ningún tratamiento (n=5). Los animales se alojaron individualmente con ambiente controlado (18-22° C, 45% humedad relativa) y un fotoperiodo de 16 h luz-8 h oscuridad. El agua y la comida (16.2% proteína, 2.5% grasa y 13.5% fibra cruda) fueron administradas *ad libitum*. Tras los tratamientos correspondientes, el día 11 post-parto, las conejas fueron sometidas a una laparotomía mid-ventral, previa anestesia con 30 mg/kg de pentobarbital sódico (i.v.), para extraer sus ovarios. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a un protocolo previamente aprobado por el Comité de Experimentación Animal y siguiendo, en este sentido, las recomendaciones de la CE (directriz 86/609 de 1986).

### Estudios morfométricos

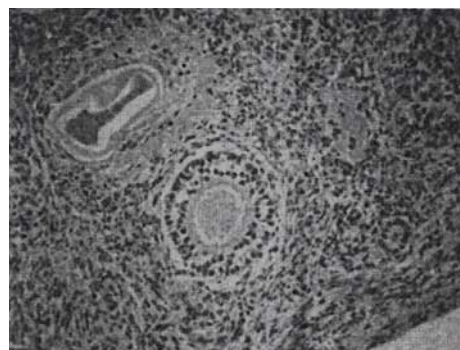
El protocolo de fijación y deshidratación de los ovarios fue el siguiente: una vez anotadas sus características morfológicas de peso, longitud y anchura y calculado el volumen de cada ovario, se introdujeron en una solución de paraformaldehído al 4% hasta que fueron procesados en el laboratorio de histología de la UCM. Posteriormente, los tejidos se lavaron con PBS 0,05 M durante 12 h, y se deshidrataron con una serie de pases por diferentes diluciones de etanol. Después se mantuvieron en una solución de etanol al 70% hasta su posterior análisis. Las muestras se tallaron, se incluyeron en parafina y se cortaron exactamente por la línea media longitudinal del hilo del órgano. Para hacer el recuento de los folículos, con un microtomo, se realizaron al menos 3 secciones de 4 $\mu$  de grosor, que posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina y se montaron en un portaobjetos. Las muestras de cada ovario así fijadas y teñidas se observaron al microscopio óptico en el departamento de Producción Animal de la UPM.

Los folículos en los que el núcleo del oocito era visible en el corte se clasificaron como primarios (un oocito rodeado de una capa de células cúbicas de granulosa), secundarios (un oocito rodeado de dos o más capas de células) y antrales (con antro folicular), tal y como muestran las imágenes.

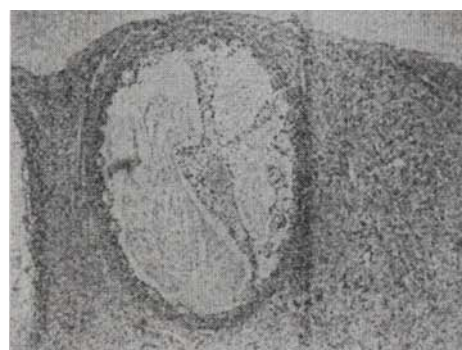
Se realizó un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 1990-2001) para estudiar el efecto del tratamiento de sincronización sobre el número de folículos de las distintas categorías presentes en los ovarios y sobre el volumen de los mismos.



**Primarios**



**Secundarios**



**Antral**

### **Técnicas inmunohistoquímicas**

Estas técnicas se emplearon para localizar los receptores de hormona de crecimiento sobre el tejido ovárico en el departamento de Fisiología animal de la UCM en colaboración con el departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la UAB. El estudio se realizó en secciones de tejido fijados en parafina mediante la técnica inmunoperoxidasa, con anticuerpos específicos de los laboratorios Novocastra Ltd. El protocolo a utilizar es el mismo descrito en trabajos anteriores (Lorenzo et al., 2001). Brevemente, las preparaciones se incubaron durante 30 minutos con peróxido de hidrógeno al 1% para suprimir la actividad peroxidasa endógena. Después, se incubó con el suero de neutralización durante 90 minutos para suprimir la unión inespecífica de inmunoglobulinas. Se añadió el primer anticuerpo y se incubó durante la noche en un recipiente humidificado, se lavaron las secciones y se añadió el segundo anticuerpo biotinilado; posteriormente, se incubó durante 1 h, se lavaron las secciones y se añadió el conjugado ABC (conjugado avidina-biotina-peroxidasa). Por último, se depositó el sustrato (3,3´ diaminobencidina tetrahidroclorhidrato), se realizó una tinción de contraste con hematoxilina y se examinó al microscopio.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las dimensiones de los ovarios fueron similares a las descritas por Gosálvez (1985), para conejas múltiparas en el día 11 post-parto, presentando un peso medio similar entre grupos ( $0,45 \pm 0,15$  y  $0,41 \pm 0,16$  g para el ovario derecho e izquierdo, respectivamente). No se han observado diferencias significativas en el volumen de los ovarios extirpados entre los diferentes grupos de conejas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Volumen de los ovarios de conejas sometidas a una separación de la camada de 24 horas (BIO), tratadas con PMSG 48 horas antes (PMSG) y sin ningún tratamiento (CONTROL).

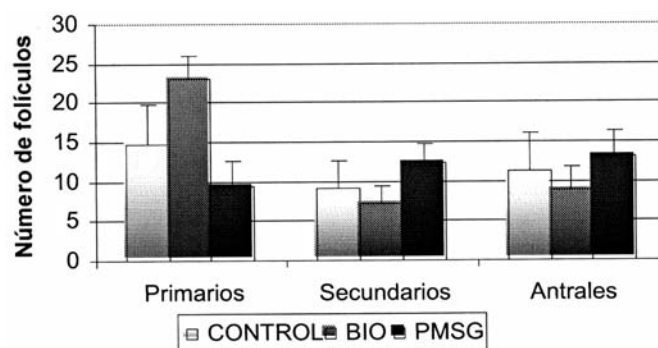
Tratamiento	Volumen (cm <sup>3</sup> s.e.m.)	
	Ovario derecho	Ovario izquierdo
CONTROL	$0,52 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,05$
BIO	$0,53 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,04$
PMSG	$0,49 \pm 0,06$	$0,49 \pm 0,05$

Todos los animales presentaban ovarios sanos y dos de ellos (uno del grupo control y otro del grupo BIO) habían ovulado espontáneamente, presentando cuerpos lúteos de reciente formación. La ovulación espontánea no es rara en la coneja y ha sido descrita por otros autores en conejas primíparas (Theau-Clément et al., 2000), pudiéndose presentar de forma aislada durante todo el post-parto, sin que hasta el momento se haya podido determinar la causa que puede desencadenarla. En el presente estudio, se han cuantificado un total de 702 folículos ováricos en los cortes sagitales fijados y teñidos. Del total de folículos contados, 175, 352 y 175 pertenecieron al grupo CONTROL, BIO y PMSG, respectivamente. El recuento de folículos realizado en la región cortical de los ovarios estudiados, coincide con resultados descritos por Gosálvez (1985), en ovarios de conejas en post-parto. La observación de los cortes sagitales de los ovarios reveló la presencia de folículos en diferentes estadios de crecimiento y atresia, similares a los que se observan en otras especies polítopas, como la cerda (Knox, 2005).

En la Figura 1 se muestran las medias de folículos primarios, secundarios y antrales de los tres grupos de conejas. El número medio de folículos secundarios y antrales fue similar en los tres grupos de conejas. Aunque el tratamiento no afectó de manera estadísticamente significativa al número de folículos primarios existentes, las conejas tratadas con PMSG presentaron una proporción ligeramente

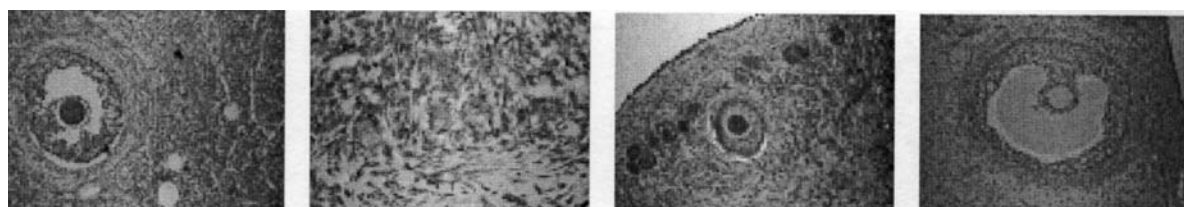
inferior al del grupo BIO y similar al del grupo CONTROL (25,7%, 58,9% y 42,3%, respectivamente;  $P=0,1$ ). Estos resultados concuerdan con estudios realizados en cerdas prepúberes (Guthrie et al., 1990), en los que se ha demostrado que la PMSG reduce el número de folículos pequeños (1-3 mm), incrementa la tasa de atresia de éstos y la de los folículos de tamaño medio (3-6 mm), y aumenta el número de folículos grandes (>6 mm). Aunque al aumentar las dosis de PMSG se observa un mayor número de folículos que escapan de la reserva de primordiales y crecen, esta gonadotropina por sí sola no es capaz de conseguir que cerdas hipofisectomizadas presenten folículos de gran tamaño, con lo que se necesitan otros factores hipotalámicos o intraováricos que gobiernen este desarrollo folicular (Kraeling et al., 1974).

Figura 1. Recuento del número de folículos primarios, secundarios y antrales de conejas controles, conejas sometidas a una separación de 24 horas de la camada (BIO) y conejas tratadas con 20 UI de PMSG 48 horas antes.



En este sentido, podríamos decir que la acción estimulante de la PMSG en los ovarios analizados, habría permitido rescatar y favorecer el crecimiento de cierto número de folículos de la reserva de folículos primordiales, mientras que en las conejas controles y BIO no se observa este reclutamiento folicular.

Finalmente, se ha observado en los tratamientos de sincronización BIO y PMSG, una elevada señal positiva en la inmunolocalización para el receptor de la GH. Las distintas microfotografías muestran algunos de los patrones inmunohistoquímicos obtenidos (de izquierda a derecha, grupo BIO, Grupo Control, Grupo PMSG y control de la técnica) en los que, en color rojo, se evidencia la localización del receptor para GH.



Esta hormona está relacionada con la proliferación de las células foliculares, y en definitiva con la foliculogénesis (Roy et al., 1999). Según el ciclo estral progresa, el crecimiento de uno o varios folículos dominantes se asocia a la disminución de aquellos más pequeños o medianos. En este sentido, el crecimiento y la dinámica folicular dependen de las gonadotropinas hipofisarias, pero el

final del desarrollo folicular también es dependiente de las concentraciones de GH (Eckery et al., 1997). Más aún, la presencia de GH parece estimular el número de folículos en crecimiento en el caso de los bovinos (Gong et al., 1993), incluso inhibiendo el desarrollo de los folículos preovulatorios (Andrade et al., 1996). Como se puede observar en las imágenes, la presencia de GHR fue más evidente en los folículos primordiales que en los folículos antrales cuyos oocitos mostraron también la presencia de GHR. Eckery et al., (1997), demostraron que el mRNA para el receptor de GH es más abundante en el oocito y células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales pequeños de la oveja. En el caso de la vaca (Kölle et al., 1998) los receptores aparecen en los oocitos de folículos primordiales y primarios, mientras que en los antrales aparecen en las células del cumulus oophorus. Todo ello indica que en la coneja, esta hormona también está implicada en cierta manera con el desarrollo folicular ovárico, pero queda por dilucidar exactamente su papel en la formación de folículos antrales que contengan y formen un oocito competente, con capacidad para madurar, ser ovulado y fecundado con normalidad. La realización de este trabajo confirma el efecto positivo de la PMSG sobre el crecimiento folicular ovárico y demuestra la existencia de receptores a GH en el tejido ovárico de conejas, abriendo nuevas vías de estudio a nivel folicular.

#### ■ AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por proyectos de investigación del MEC (AGL-2002-00310 y AGL-2005-0196). La investigación de M. Arias-Álvarez está financiada por ayudas de la Comunidad de Madrid y por el Fondo Social Europeo.

## BIBLIOGRAFIA

- ANDRADE L.P., RHIND S.M., WRIGHT I.A., MCMILLEN S.R., GODDARD P.J., BRAMLEY T.A. 1996. Effects of bovine somatotrophin (bST) on ovarian function in post-partum beef cows *Reproduction, Fertility and Development* 8: 951-960.
- BACHELOT A., MONGET P., IMBERT-BOLLORÉ P., COSHIGANO K., KOPCHICK J.J., KELLY P.A., BINART N. 2002. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinology* 143: 4104-4112.
- BONANNO A., BUDETTA G., ALABISO M., ALICATA M.L. 1990. Effetti del trattamento PMSG-GnRH sull'efficienza ovulatoria delle coniglie. *Acta Medica Veterinaria* 36: 441-451.
- ECKERY D.C., MOELLER C.L., NETT T.M., SAWYER H.R. 1997. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insuline-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 57: 507-513.
- FORTUNE J.E. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science* 78: 135-163.
- GONG J.G., MCBRIDE D., BRAMLEY T.A., WEBB R. 1994. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. *J Endocrinol* 143: 157-164.
- GOSÁLVEZ L.F. 1985. *Actividad ovárica de la coneja doméstica después del parto*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- GUTHRIE H.D., BOLT D.J., COOPER B.S. 1990. Effects of gonadotropin treatment on ovarian follicle growth and granulosa cell aromatase activity in prepubertal gilts. *J. Anim. Sci.* 68: 3719-3726.
- KELLY C.R., KOPF J.D., ZIMMERMAN D.R. 1988. Follicular atresia, follicular fluid hormones, and circulating hormones during the midluteal phase of the estrous cycle in pigs. *Biol. Reprod.* 55: 543-547.
- KNOX R.V. 2005. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domestic Animal Endocrinology* 29: 385-397.
- KÖLLE S., SINOWATZ F., BOIE G., LINCOLN D. 1998. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol. Reprod.* 59: 836-842.
- KRAELING R.R., DAVIS B.J., GERRITS R.J. 1974. Ovarian response of the hypophsectomized pig to pregnant mare's serum gonadotrophin. *Biol. Reprod.* 10: 116-119.
- LORENZO P.L., LIU I.K.M., ILLERA J.C., PICAZO R.A., CARNEIRO G.F., ILLERA M.J., CONLEY A.J., ENDERS A.C., ILLERA Y.M. 2001. Influence of epidermal growth factor on mammalian oocyte maturation via tyrosine-kinase pathway. *J. Physiol. Biochem.* 57: 515-22.
- MAERTENS L. 1998. Effect of flushing, mother litter separation and PMSG on the fertility of lactating does and the performance of their litter. *World Rabbit Science* 6: 191-199.
- REBOLLAR P.G., MILANÉS A., PEREDA N., MILLÁN P., SILVÁN G., ESQUIFINO A.I., CANO P., LORENZO P.L. 2005. Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe-litter separation or ecg injection: reproductive parameters and endocrine profiles. *Anim. Reprod. Sci.*, in press. Available in [www.elsevier.com/locate/anireprosci](http://www.elsevier.com/locate/anireprosci).
- SAS 1999-2001. *Sas/stat user's guide* (release 8.2). Sas inst. Inc., Cary, NC.
- THEAU-CLÉMENT M., BOITI C., MERCIER P., FALIÈRES J. 2000. Description of the ovarian status and fertilising ability of promiparous rabbit does at different lactation stages. *7<sup>th</sup> World Rabbit Congress*, vol A, 259-272.
- UBILLA E., REBOLLAR P.G., PAZO D., ESQUIFINO A.I., ALVARIÑO J.M.R. 2000. Pituitary and ovarian response to transient doe-litter separation in nursing rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility* 118: 361-366.
- UBILLA E., REBOLLAR P.G. 1995. Influence of the postpartum day on plasma estradiol-17 levels, sexual behaviour and conception rate in artificially inseminated lactating rabbits. *Anim. Reprod. Sci.* 38: 337-344.
- ZACZEK D., HAMMOND J., SUEN L., WANDJI S., SERVICE D., BARTKE A., CHANDRASHEKAR V., COSCHIGANO K., KOPCHICK J. 2002. Impact of growth hormone resistance on female reproductive function: new insights from growth hormone receptor knockout mice. *Biol Reprod.* 67: 1115-1124.