



Respuesta hipofisaria y ovulatoria de conejas sometidas a diferentes tratamientos de inducción a la ovulación

Ovulatory response of pituitary and rabbits subjected to different treatments of ovulation induction

Millán P.^{1*}, Villa A.¹, Sakr O.G.², Velasco B.², Rebollar P.G.²

¹ Dept. de Fisiología (Fisiología Animal), Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

² Dept. de Producción Animal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, España

*Dirección de contacto: pmillanp@vet.ucm.es

Resumen

En el manejo reproductivo de las granjas cunícolas mediante inseminación artificial (IA), por las características reproductivas de esta especie, es necesario utilizar un sistema de inducción a la ovulación, siendo el más utilizado el tratamiento de análogos de la GnRH como la buserelina. La vía de administración del tratamiento puede ser intramuscular (i.m.) y también, intravaginal. En este estudio, hemos valorado la respuesta hipofisaria y ovulatoria a la administración intramuscular (BM) o intravaginal (BV) de buserelina, así como sólo a la deposición de semen puro (SP) o de solución salina (S) intravaginales, sin inducir la ovulación. Para determinar la respuesta hipofisaria a estos tratamientos hemos analizado los niveles séricos de LH hipofisaria a los 0 y 60 minutos de la IA, mediante el desarrollo y validación de un enzimoimmunoensayo (EIA) específico para esta especie. La respuesta ovulatoria y de gestación ha sido determinada mediante laparotomía. En los grupos BM y BV se obtuvieron concentraciones séricas de LH más altas que en los otros grupos y similares entre sí a los 60 minutos de la inducción. Las conejas del grupo SP también presentaron incrementos en las concentraciones séricas de LH a los 60 minutos, no tan elevadas como las de los grupos BM y BV, pero significativamente más altas que las del grupo S. Las tasas de ovulación fueron más bajas en los grupos SP y P con respecto a las de los grupos BM y BV. Con los resultados obtenidos, podemos concluir indicando que el tratamiento con buserelina por vía intramuscular como transvaginal provoca incrementos de los niveles séricos de LH que han servido para validar biológicamente el EIA específico para conejo desarrollado en este trabajo y necesarios para que se produzca la ovulación. Además, la respuesta hipofisaria de las conejas inseminadas con semen puro, ha incrementado significativamente la producción de LH frente al grupo inseminado con solución salina, pareciendo indicar que pudiera existir algún factor inductor a la ovulación presente en el semen.

Palabras clave: Conejas, LH, buserelina, ovulación.

Abstract

In rabbit reproductive managements by means Artificial Insemination (AI), it is needed the ovulation induction with GnRH analogues as busereline. Their administration can be intramuscularly (i.m.) or intravaginal with the seminal dose. In this study, we have evaluate the pituitary and ovulatory response to the i.m. (BM) intravaginal (BV) administration of busereline, as well as the sole raw semen (SP) or the saline solution intravaginal deposition without ovulation induction. To study the pituitary response to these treatments we have developed and validated an enzymoimmunoassay rabbit specific to determine serum LH at 0 and 60 minutes post-AI. A laparotomy was made in all does to determine ovulatory and pregnancy response. In BM and BV groups the serum LH concentrations were higher than in the other groups but similar to each other at 60 minutes post-induction. Group SP also showed increased serum LH concentrations at 60 minutes post-AI with respect S group, but not so high as in groups BM and BV. With these results, we could conclude that an intramuscularly and intravaginal treatment can induce a serum LH increasing enough to validating a specific EIA to LH of rabbit. Moreover, the pituitary response of rabbit does inseminated

with raw semen has been higher than in the group inseminated only with saline, indicating the presence of some molecule in the semen that could be absorbed from vaginal mucosa to induce ovulation.

Key words: Rabbit does, LH, buserelin, ovulation.

Introducción

La coneja presenta características reproductivas diferentes a otras especies derivadas de la ausencia de un ciclo estral definido y regular ya que, la ovulación es inducida por el coito más que por el “feedback” positivo de los estrógenos. La monta genera un reflejo neuroendocrino que estimula la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo (Pau y Spies, 1986; Kaynard et al., 1990), con la consiguiente descarga preovulatoria de la hormona luteinizante (LH) lo que desencadena el proceso de maduración del oocito y la ovulación (Mills y Gerardot, 1984; Pau et al., 2000).

El manejo reproductivo en las granjas de conejos ha cambiado en los últimos 20 años gracias a la introducción de nuevas tecnologías. La inseminación artificial (IA) y la sincronización del celo de las conejas ha reducido en gran medida el tiempo que se dedicaba al manejo de un conejar, permitiendo agrupar las tareas sin excesivo detrimento de la fertilidad ni la prolificidad.

El método de inducción a la ovulación más ampliamente utilizado en las granjas cunícolas consiste en la aplicación de derivados de la GnRH por vía intramuscular en el momento de la inseminación. Recientemente, algunos estudios han demostrado que se puede inducir la ovulación en las conejas incluyendo análogos de GnRH en la dosis seminal (Viudes de Castro et al., 2000, Quintela et al., 2004; Ondruska et al., 2008, Quintela et al., 2008). Estos compuestos se absorberían a través de la mucosa vaginal, evitando, de esta forma, la aplicación intramuscular y obteniendo resultados similares de fertilidad en hembras receptoras. En algunos experimentos realizados en otras especies de ovulación inducida, depositando una dosis intravaginal de semen puro homólogo se han observado respuestas ovulatorias en un elevado porcentaje de hembras (87,5% en camellos; Chen et al., 1985; 100% en llamas; Ratto et al., 2006), sugiriendo la presencia de algún factor en el semen que puede contribuir a estas respuestas. En la actualidad, la respuesta hipofisaria a la deposición de semen puro en la vagina de las conejas no se ha estudiado.

El objetivo de nuestro estudio es comprobar la respuesta hipofisaria y liberación de LH en conejas utilizando un análogo de la GnRH como la buserelina, aplicado tanto por vía intramuscular como intravaginal mezclado con la dosis seminal. Así como comprobar si la deposición de semen puro en vagina puede desencadenar respuestas similares. Para ello se ha desarrollado y validado un ELISA competitivo específico para la determinación de LH de conejos que previamente no existía.

Material y métodos

Se utilizaron un total de 32 conejas (*Oryctolagus cuniculus*) híbridas (Neozelandés blanco x Californiano) y 10 machos como donadores de semen. Los animales fueron alojados en la granja experimental del Dpto. de Producción Animal de la Universidad Politécnica de Madrid (20-25° C, 16 HL: 8 HO). Todas las conejas fueron inseminadas con un catéter estándar de vidrio curvo (22 cm de largo) y se distribuyeron en 4 grupos:

Grupo Buserelina intramuscular (BM): 8 hembras se inseminaron con un pool de espermatozoides fresco heterospérmico utilizando una dosis de 20 millones de espermatozoides en 0,5 ml de Tris-citrato-glucosa como diluyente. Para inducir la ovulación se aplicó una inyección intramuscular de 1 µg de acetato de buserelina (Suprefact, Hoechst Marion Roussel, SA Madrid, España).

Grupo Buserelina intravaginal (BV): 8 hembras (2L, 2NL, 4 NUL) se inseminaron de forma similar que el grupo BM y la ovulación se indujo con el análogo de la GnRH (acetato de buserelina, Suprefact, Hoechst Marion Roussel, SA Madrid, España) añadido a la dosis seminal diluida (10 µg/0,5 ml).

Grupo semen puro (SP): 8 hembras se inseminaron con semen puro que se obtuvo a partir de 8 machos (0,5 ml/hembra) y recibieron una inyección de solución salina i.m.

Grupo salino (S): 8 hembras se inseminaron con 0,5 ml de solución salina y recibieron también una inyección de solución salina i.m.

La toma de muestras de sangre se realizó en todos los grupos a la misma hora para evitar variaciones circadianas, en la vena auricular externa. La sangre se centrifugó para obtener el suero, que se congeló a -32°C para su posterior análisis. Se tomaron muestras sanguíneas para determinar las concentraciones de LH antes y después de la IA (0 y 60 minutos).

Para estudiar la tasa de ovulación y de gestación, todas las conejas fueron sacrificadas en una cámara de CO₂ (5 min) el día 14 post IA, y se les practicó una laparotomía para poder contar el número de cuerpos lúteos y embriones en el ovario y en el útero, respectivamente.

La LH plasmática de las conejas se analizó utilizando un ELISA de competición desarrollado específicamente para esta especie. Las placas de 96 pocillos se tapizaron con un anticuerpo policlonal anti LH de conejo (AFP-3120489; NIDDK's National Hormone and Pituitary Program, prof. A.F. Parlow (National Hormone and Pituitary Program, Harbor- Ucla Medical Center, Torrance CA, USA). Posteriormente, se añadieron los estándares (AFP-7818C, NIDDK) desde 400 a 0,3 ng/ml y las muestras junto con el conjugado formado por la hormona marcada con biotina. Tras el periodo de competición de la hormona sin marcar y la marcada, se añadió estreptavidina-HRP. Una vez unidas la estreptavidina a la biotina, se añadió el sustrato TMB que reaccionó con la enzima HRP produciendo una reacción coloreada que fue medida con un espectrofotómetro (Epoch, Bio-Tek). Las absorbancias se transformaron en concentraciones utilizando un software Gen 5 (Bio-Tek) refiriendo dichos valores a la curva estándar ajustada. La concentración menor de LH que se pudo distinguir de 0 fue 39,06 pg/pocillo (0,78 ng/ml). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron siempre inferiores a 5,9 y 9,1 %, respectivamente.

Todos los procedimientos experimentales han sido aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Politécnica de Madrid y cumplen la normativa vigente para el cuidado y uso de animales de experimentación (BOE, 2005).

Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico SAS (SAS/STAT 1999-2001). Las concentraciones séricas de LH se analizaron con el procedimiento MIXED incluyendo la interacción entre tratamientos (BM, BV, SP y S) y el tiempo (0

y 60 min) como efectos principales. Se realizaron dos análisis para comparar las concentraciones séricas de LH: con todas las hembras (ovuladas o no) y solamente con las que ovularon. Las medias se compararon mediante el test *t* de Student. Las diferencias entre medias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$. El efecto de los tratamientos sobre el número de cuerpos lúteos y embriones se analizó con un análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM. El efecto de los tratamientos sobre las tasas de ovulación y gestación se analizó con una χ^2 utilizando el procedimiento CATMOD.

Resultados y discusión

Todos los animales cuya ovulación fue inducida mediante administración de buserelina i.m. o transvaginal, ovularon y tuvieron la tasa de gestación más elevada (Tabla 1). Estas tasas de ovulación son similares a las obtenidas por otros autores (Quintela et al., 2004; Viudes de Castro et al., 2007; Vicente et al., 2008). El grupo inseminado con semen puro presentó una tasa de ovulación más baja y similar al grupo inseminado con solución salina, pero la mitad de las primeras quedaron gestantes. Se puede decir, por tanto, que la respuesta ovulatoria y de gestación a la deposición del semen puro no fue tan eficaz como la administración exógena de la hormona. La introducción del catéter (estímulo nervioso) en los grupos SP y S pudo ser uno de los desencadenantes de la inducción de la ovulación en prácticamente la mitad de los animales y permitió, que la mitad de las conejas del grupo SP quedaran gestantes.

Todas las hembras que ovularon de todos los grupos presentaron un número similar de cuerpos lúteos y tampoco se observaron diferencias en el número de embriones, excepto para las conejas inseminadas con solución salina en las que tal y como se esperaba no quedó ninguna gestante.

Tabla 1. Tasa de ovulación (TO) y de gestación (TG) de conejas inseminadas e inducidas con buserelina i.m. BM (1 μ g/coneja), con buserelina en la dosis seminal BV (10 μ g/0,5 ml por coneja), inseminadas con un pool de semen puro de 8 machos (0,5 ml/hembra) y solución salina i.m. (SP), e inseminadas y tratadas con 0,5 ml de solución salina (S).

Grupo	TO (%)	TG (%)	Cuerpos Lúteos ¹	Embriones ²
BM	100 a	70 a	11,0 \pm 0,98 a	10,4 \pm 1,29 a
BV	100 a	100 a	11,8 \pm 0,70 a	12,0 \pm 0,68 a
SP	62,5 b	50 b	12,2 \pm 0,73 a	13,3 \pm 0,75 a
S	50 b	0 c	13,5 \pm 1,55 a	0 b

(a, b, c: $P < 0,05$) ¹ Número medio de cuerpos lúteos de las conejas que ovalaron. ² Número medio de embriones de las conejas gestantes.

Las conejas que ovularon tuvieron concentraciones medias de LH superiores a las que no ovularon (197,9 \pm 3,1 vs. 45,9 \pm 4,1 ng/ml; $P < 0,0001$). Estos valores son superiores a los obtenidos por Quintela et al. (2004) que utilizó un EIA validado en rata. Probablemente, las variaciones aplicadas a nuestro ensayo (el empleo de un segundo anticuerpo y la amplificación con streptavivina-biotina) han incrementado la sensibilidad de esta técnica aportando mayor sensibilidad y exactitud a la misma.

En la Figura 1 se puede observar que todos los grupos presentaron concentraciones basales medias de LH similares en el momento de la inseminación (45,9 \pm 4,1 ng/ml). Sin embargo, a los 60 minutos tanto en el grupo BM como en el grupo BV, los niveles séricos de LH se incrementaron (251 \pm 35,5 y 275 \pm 46,2

ng/ml; respectivamente $P < 0,05$), con respecto a los valores obtenidos a 0 minutos, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Incluyendo hembras ovuladas y no ovuladas, las concentraciones séricas de LH en el grupo S fueron las más bajas, mientras que en el grupo SP tuvieron un valor intermedio ($44,0 \pm 2,85$ y $65,6 \pm 8,44$ ng/ml, $P < 0,05$ respectivamente). Pero además, excluyendo las conejas no ovuladas, en el grupo SP las concentraciones se elevaron a $81,6 \pm 4,4$ ng/ml y en las del grupo S se redujeron aún más ($46,5 \pm 4,96$ ng/ml; $P < 0,001$).

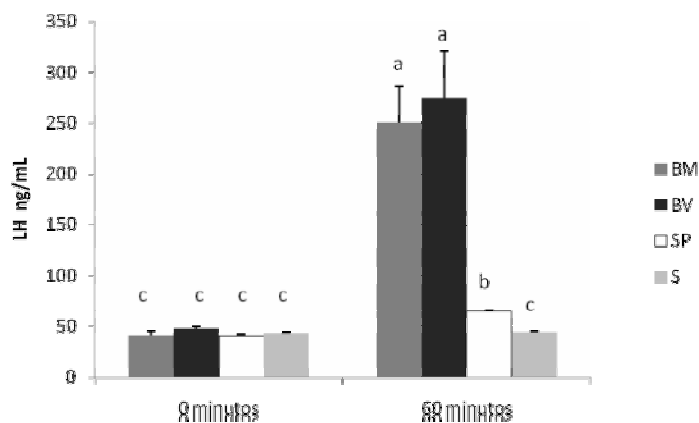


Figura 1. Concentraciones séricas de LH de conejas inseminadas e inducidas con buserelina i.m. BM ($1\mu\text{g}/\text{coneja}$), con buserelina en la dosis seminal BV ($10\mu\text{g}/0,5\text{ ml}$ por coneja), inseminadas con un pool de semen puro de 8 machos ($0,5\text{ ml}/\text{hembra}$) y solución salina i.m. (SP), e inseminadas y tratadas con $0,5\text{ ml}$ de solución salina (P). (a, b, c: $P < 0,05$).

Tras analizar los resultados podemos indicar que en los grupos tratados con buserelina tanto por vía intramuscular como por vía intravaginal se observa un pico preovulatorio de LH de magnitud semejante, estimulando la liberación de oocitos en la ovulación. Es curioso el resultado de los niveles de LH del grupo SP. Estas conejas no consiguen valores de LH tan altos como los de los animales tratados con buserelina pero sí que lo consiguen con respecto al grupo S, considerado como control negativo. En este último grupo, algún estímulo al inseminar (sujeción, introducción del catéter, i.m. inyección de sol. salina) pudieron ser suficientes como para inducir la ovulación en un 50% de las hembras, demostrando que el estímulo nervioso es muy importante en las conejas receptoras. En el caso de las conejas inseminadas con semen puro, el efecto simultáneo de la deposición del semen y la posible existencia de algún factor en el mismo ha podido aumentar las concentraciones séricas de LH al compararlas con el grupo S. Por lo tanto, podríamos sugerir la posible existencia de alguna molécula que pueda ser absorbida, transportada por el torrente sanguíneo a la hipófisis y que liberaría LH al suero. Silva et al. (2011) han publicado algunas evidencias de que existe dicho factor en el semen de los conejos. Sin embargo, todavía no se conoce su origen, su estructura química ni su acción biológica exacta. En otras especies, se ha sugerido que existen factores en el plasma seminal que podrían contribuir a la secreción de LH (alpacas, Paolicchi et al. (1999); llamas, Ratto et al. (2010)) y, por tanto, inducir la ovulación en hembras receptoras de estas especies que también son de ovulación inducida.

Conclusión

La respuesta hipofisaria a la liberación de LH de las conejas tratadas con un sistema de ovulación con buserelina, tanto por vía intramuscular como intravaginal es similar por lo cual es una ventaja en el manejo de estos animales en los programas de producción cunícola. El incremento de los niveles de LH en conejas inseminadas con semen puro y sin tratamiento inductor a la ovulación, pese a ser inferior a los animales anteriormente mencionados, fue superior a los animales considerados como controles negativos, indicando que el estímulo nervioso unido a la posible existencia de un factor inductor a la ovulación en el plasma seminal queda por investigar.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido subvencionada por los proyectos AGL08-022283 y CCG10-UCM/SAL-5601.

Bibliografía

- Boletín Oficial del Estado 2005. Real Decreto 1201/2005. Sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE, 252:34367-34391.
- Kaynard A.H., Pau K.Y.F., Hess D.L., Spies H.G. 1990. Gonadotrophin-Releasing Hormone and Norepinephrine release from the rabbit mediobasal and anterior hypothalamus during the mating-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 127:1176-1185.
- Mills T.M., Gerardot R.J. 1984. Dissociation of copulation from ovulation in pregnant rabbits. *Biol. Reprod.*, 30:1243-1252.
- Ondruska L., Parkányi V., Rafay J., Chlebec I. 2008. Effect of LHRH analogue included in seminal dose on kindling rate and prolificacy of rabbits artificially inseminated. In Abstracts Proceeding of 9th World Rabbit Congress, June 10-13, 2008, Verona Italy, (Xiccato G., Trocino A., Lukefhar SD eds.) pp. 122.
- Paolicchi F., Urquieta B., Del Valle L., Bustos-Obregón E. 1999. Biological activity of the seminal plasma of alpacas: stimulus for the production of LH by pituitary cells. *Anim. Reprod. Sci.*, 54 :203-210.
- Pau C.Y., Pau K.Y., Berria M., Spies, H. 2000. Ovarian influence on gonadotropin and prolactin release in mated rabbits. *Endocrine*, 13:25-35.
- Pau K.Y., Spies H.G. 1986. Estrogen-dependent effects of norepinephrine on hypothalamic Gonadotropin-releasing Hormone release in rabbit. *Brain. Res.*, 399:15-23.
- Quintela L.A., Pela, 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. *Reprod. Nutr. Dev.*, 44:79-88.
- Quintela L.A., Peña A.I., Vega M.D., Gullón J., Prieto C., Barriuo M., Becerra J.J., Herradón P.G. 2008. Ovulation induction in rabbit does by intravaginal administration of the GnRH analogue [Des-Gly10, D-Ala6] LHRH ethylamide: field trial. In Abstracts Proceeding of 9th World Rabbit Congress, June 10-13, 2008, Verona Italy, (Xiccato G., Trocino A., Lukefhar SD (eds.) pp. 123.
- Ratto M.H., Huanca W., Adams G.P. 2010. Ovulating-inducing factor: a protein component of llama seminal plasma. *Reproduct. Biol. Endocrinol.*, 8:44.
- SAS/STAT, 1999-2001. SAS 7. STAT User's Guide (Release 8.2). SAS Inst. INC., Cary, NC.
- Silva M., Niño A., Letelier C., Godoy R., Adams G.P., Ratto MH. 2011. Is ovulation-inducing factor present in the seminal plasma of rabbits? Abstracts of the Society of the Study of Reproduction Meeting. C-615.
- Vicente J.S., Lavara R., Lavara F., Marco-Jiménez F., Viudes de Castro M.P. 2008. Rabbit reproductive performance after insemination with buserelin acetate extender. *Livest. Sci.*, 115:153-157.
- Viudes de Castro M.P., Lavara R., Marco-Jiménez F., Cortell C., Vicente J.S. 2000. Ovulation induced by mucosa vaginal absorption of buserelin and triptorelin in rabbit. *Theriogenology*, 68:1031-1036.