

# ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA MIGRACIÓN DE GRÁNULOS CORTICALES EN OOCITOS DE CONEJAS SOMETIDAS A DISTINTOS MÉTODOS DE SINCRONIZACIÓN DE CELO

Rebollar P.G.<sup>1</sup>; Lorenzo P.L.<sup>2</sup>; Carneiro G.F.<sup>3</sup> y Liu I.K.M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Producción Animal. E.T.S.I. Agrónomos. UPM. <sup>2</sup>Dpto de Fisiología Animal. Fac. Veterinaria. UCM. Cdad. Universitaria s/n. 28040 Madrid, España. <sup>3</sup>Dep. of Population Health and Reproduction. School of Veterinary Medicine University of California, Davis, CA95616 USA.

## INTRODUCCIÓN

La aplicación de ritmos de inseminación artificial de 42 días (31 días de gestación y 11 de lactación) en la coneja implica una mayor incidencia de casos de baja receptividad sexual debido a la influencia negativa de la lactación. Para paliar dicho inconveniente se han aplicado variados métodos de sincronización de celo hormonales, pero progresivamente se ha ido extendiendo la posibilidad de evitarlos aplicando otros de manejo, tanto por el bienestar del animal como por la salud del consumidor. En parte, el éxito de los tratamientos hormonales se basaría en una mejora importante de la maduración intrafollicular de los oocitos, previa –e imprescindible- a la ovulación. En los oocitos de mamífero, la migración de los gránulos corticales es un paso muy importante en la maduración citoplasmática de los mismos, y ha sido utilizada ampliamente como un criterio significativo para aseverar una correcta maduración y como muestra de la capacidad fecundante del propio oocito (Cran y Esper, 1990). Además, una migración adecuada permite la exocitosis de los gránulos corticales, después de la interacción oocito-espermatozoide, lo que impide la polispermia (Ducibella, 1998).

En cuanto a los métodos de manejo empleados para sincronizar el celo, se ha comprobado que una separación transitoria (48 horas) de la coneja, impidiendo la entrada al nido y el amamantamiento de la camada, descende significativamente su prolactinemia, de forma que cuando son inseminadas tras esta separación y tratadas con gonadorelina presentan tasas plasmáticas de estradiol-17 $\beta$  y picos preovulatorios de LH significativamente mayores que conejas controles (Ubilla et al., 2000). Dado que los tratamientos de manejo y los hormonales han permitido mejorar significativamente la fertilidad en estudios realizados a gran escala (Alvariño et al., 1998; Theau-Clément et al., 1999), y han determinado un número superior de folículos ováricos mayores de 1mm (Rebollar et al., 2000) que en conejas sin ningún tipo de tratamiento, hemos querido determinar si existirían también diferencias en cuanto a la distribución de los gránulos corticales que, en condiciones normales, migran durante la maduración intrafollicular del oocito (Cran y Esper, 1990). De este modo podríamos hacer una aproximación de cómo afectan estos dos métodos de sincronización de celo en los mecanismos fisiológicos de desarrollo folicular y preparación del oocito para ser ovulado.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado los oocitos procedentes de los ovarios de 6 conejas lactantes (con más de 8 gazapos), que en el día 9 post-parto recibieron los siguientes tratamientos:

- *PMSG*: 25 UI de PMSG, i.m., (Serigán, Lab. Ovejero)
- *BIO*: se cerró el nido a las 10 de la mañana impidiendo que amamantaran a sus camadas hasta 48 horas más tarde.
- *Control*: no recibieron ningún tratamiento.

Pasadas 48 horas (en el día 11 post-parto) se permitió el acceso al nido de las conejas del grupo BIO. Para estudiar la distribución de los gránulos corticales, se sacrificó (2,5 ml de Euthalender, i.v.) a una coneja de cada tratamiento a las 10 de la mañana del día 11 post-parto (-GON) y a otra, 8 horas después de haber sido tratadas con 20 µg de gonadorelina (+GON) (Inducel-GnRH, Lab. Ovejero). Para obtener los oocitos de coneja (Lorenzo et al., 1996), se seleccionaron los folículos ováricos (> 1mm de diámetro), utilizando una lupa estereoscópica, recogiendo los oocitos resultantes en placas Petri; finalmente, fueron lavados en PBS a 37°C antes de su procesamiento para microscopía confocal.

Una vez obtenidos, los oocitos se desnudaron del cúmulo celular utilizando 0.1% de pronasa en HbT. Posteriormente se fijaron en paraformaldehído al 2% en PBS durante 6h a 4°C y se lavaron con PBS dos veces. Después, se trataron con 0,1% de Triton X-100 en PBS durante 5 minutos y se incubaron con 100 µg/ml con un conjugado de FITC (fluoresceína isotiocianato) y lectina (LCA: aglutinina de *Lens culinaris*) en PBS durante 15 minutos (Carneiro et al, 2000). Tras ello, los oocitos se tiñeron con propidio iodado (Molecular Probes) para valorar la maduración nuclear. Finalmente, los oocitos se montaron en un portaobjetos, se cubrieron por un cubre sujetado con silicona utilizando procedimientos descritos anteriormente (Lorenzo et al, 1994) y se guardaron en oscuridad a 4°C hasta su visualización. Los controles para el marcaje consistieron en la fijación de los oocitos sin Triton X-100 ni LCA. Los oocitos se visualizaron con un sistema de imagen confocal (MRC-500) unido a un láser de argón (Bio-Rad Microscience). Las imágenes confocales fueron obtenidas mediante un objetivo Olympus a 60x, utilizando un algoritmo de integración de tipo Kalman. Se analizaron un total de 48 oocitos, divididos en 8 oocitos por tratamiento (n=24 por grupo experimental).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio no se encontraron diferencias apreciables en la distribución de los gránulos corticales entre los tres tratamientos (control, BIO y PMSG) en el primer grupo, es decir antes de inducir la ovulación con gonadorelina (-GON). Sin embargo, 8 horas más tarde de dicha inducción (+GON), los oocitos de los tratamientos BIO y PMSG, presentaron una marcada migración centrífuga de los gránulos corticales, agrupándose bajo la membrana

plasmática del oocito. Por el contrario, en los oocitos control se localizó un número alto de gránulos corticales en posiciones internas. Esto significó que la maduración citoplásmica de los oocitos del grupo control, que no la nuclear puesto que sus estadios meióticos correspondieron a los de metafase II, se encontró claramente retrasada respecto de los otros dos grupos (BIOS y PMSG). La significación fisiológica de este dato concuerda con una mejor tasa de maduración citoplasmática en estos grupos de oocitos 8 horas después de recibir una dosis de 20 µg de gonadorelina, corroborando los resultados obtenidos de la inspección morfológica de los ovarios (número y tamaño de folículos) (Rebollar et al. 2000) y los obtenidos tras la inseminación (porcentajes de fertilidad) (Alvariño et al. 1998), que son superiores en los dos grupos BIOS y PMSG, respecto del grupo control.

Aunque se han demostrado los cambios morfológicos sufridos por los gránulos corticales durante la maduración de los oocitos, la mayoría de estos estudios han sido realizados mediante microscopía electrónica de transmisión (revisados por Ducibella, 1998). Otros trabajos, realizados en hamster han descrito la visualización y características de los gránulos corticales utilizando lectinas fluorescentes (Cherr et al., 1998). Este método, que es el utilizado en el presente estudio, permite una rápida visualización y examen de la distribución de los gránulos corticales en oocitos completos durante su maduración, e indican que las lectinas fluorescentes pueden ser empleadas para detectar las características de la migración de los gránulos corticales en oocitos de coneja mediante técnicas de microscopía confocal. Nuestras observaciones señalan también que la maduración citoplasmática de los oocitos de conejas sometidas a tratamientos de sincronización de celo presenta una pauta en la morfología de la migración de los gránulos corticales similar a la correspondiente con el periodo inmediatamente anterior a la fecundación. Estos datos preliminares podrían explicar inicialmente el hecho de que los tratamientos de sincronización de celo utilizados en conejas lactantes (separación transitoria de la camada y PMSG) y aplicados a gran escala permitan conseguir mejores resultados de fertilidad si se comparan con conejas controles.

Los autores agradecen a Consuelo Sansegundo y a Franck Ventimiglia (ICL, Davis-USA) su inestimable ayuda en este estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alvariño J.M.R., del Arco J.A.; Bueno A. (1998). *World Rabbit Science*, 6 (1), 191-194.  
Carneiro G.F., Lorenzo P.L., Ball B.A. Liu I.K.M. (2000). *Int. Con. Mol. Biol.* 2, 123.  
Cherr G.N., Drobniz E.Z., Katz, D.F. (1988). *J. Exp Zool*, 246, 81-93.  
Cran D.G., Esper, C.R. (1990). *J. Reprod. Fertil* (supp. 42), 177-188.  
Ducibella T. (1998). *Theriogenology*, 49, 53-65.  
Lorenzo P.L., Illera M.J., Illera J.C. and Illera M. (1994) *J. Reprod. Fert.* 101, 697-701.  
Lorenzo P.L., Rebollar P.G., Illera M.J., Illera J.C., Illera M. and Alvariño J.M.R. (1996) *J. Reprod. Fert.* 107, 109-117.  
Rebollar P.G.; Ubilla E.; Lorenzo P.L.; Sánchez-Dávila M.; Sánchez J.; Tucker L.; Alvariño J.M.R. (2000). 7<sup>th</sup> World Rabbit Congress, Valencia, Spain. Vol. A, (239-244).  
Theau-Clément M. and Mercier P. (1999). *World Rabbit Science*, 6 (1), 179-184.  
Ubilla E.; Rebollar P.G.; Pazo D.; Esquifino A.I. and Alvariño J.M.R. (2000). *J. Reproduction and Fertility*, 118, 361-366.