

Desarrollo folicular en la coneja

M. Arias-Álvarez*, RM. García-García*, PG. Rebollar**, PL. Lorenzo*

* Departamento de Fisiología (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Ciudad universitaria s/n. 28040 Madrid. España. m.arias@vet.ucm.es

** Departamento de Producción Animal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad universitaria s/n. 28040 Madrid. España

Resumen

El conocimiento de la fisiología de la reproducción es fundamental para mejorar los parámetros reproductivos en conejas sometidas a ritmos intensivos de producción, así como para aumentar los rendimientos económicos de una granja cunícola. Por ello, este trabajo trata de revisar los conocimientos existentes hasta el momento sobre la dinámica folicular en la coneja. Se pretende conocer mejor las características morfológicas y funcionales de los folículos ováricos durante el desarrollo folicular, así como la relación de la actividad ovárica de la coneja con el comportamiento sexual y la lactación. Esta última es uno de los principales factores que limitan el éxito reproductivo, el cual depende, a su vez, del éxito progresivo de varios procesos fisiológicos como son la ovulación, la fecundación, la implantación y la supervivencia embrionaria. Además, se describe el papel que juega el oocito a lo largo de la folículo-génesis, así como la influencia de los factores endocrinos, paracrinos y autocrinos en los procesos de diferenciación, proliferación y esteroidogénesis celular, que intervienen en el desarrollo de los folículos ováricos. Todos estos procesos tienen como fin formar un oocito competente apto para ser ovulado, fecundado y capaz de dar lugar a un embrión normal que conduzca al nacimiento de gazapos.

Palabras clave: oocito, folículo, coneja.

Summary

Follicular development in rabbit

The understanding of the physiology of reproduction is essential to improve the reproductive parameters and the economic benefits, especially in rabbits that are subjected to a high rhythm of production. This paper is focused to review the current advances in follicular dynamics in rabbit. To better understand the relationship between ovarian activity and sexual behaviour and lactation, both morphological and functional characteristics of ovarian follicles during folliculogenesis are described. Lactation in rabbit is a physiological status, which influences the reproductive success of this specie. Nevertheless, this reproductive achievement also depends on success of different and progressive physiologic process like ovulation, fertilization, implantation and embryo survival. Moreover, this review highlights the relevance of oocyte through follicular development; endocrine, paracrine and autocrine factors are involved in differentiation, proliferation and cellular steroidogenesis processes implied in ovarian follicular development and formation of a competent oocyte capable to ovulate, be fertilized and give rise to survival embryos and newborns.

Key words: oocyte, follicle, rabbit.

Introducción

A diferencia de lo que ocurre en otras especies, como la oveja (Sawyer *et al.*, 2002) o la vaca (Leibfried-Rutledge, 1999), en las que todos los folículos primordiales necesarios para la vida reproductiva del animal se forman durante el desarrollo fetal, en la coneja, la formación de la mayoría de estos folículos se produce en el periodo postnatal, alrededor de las dos o tres semanas de edad (Peters *et al.*, 1965; Van der Hurk *et al.*, 1997; Hutt *et al.*, 2006). En esta especie, la pubertad se alcanza en torno a las 10-11 semanas de vida (Díaz, 1987; Alvariño, 1993), y la tasa de ovulación es mayor a partir de las 17 semanas (Díaz, 1987); por ello, la edad de la primera cubrición se sitúa habitualmente en torno a las 20 semanas, momento en el que el animal alcanza el peso adecuado reflejado indirectamente por los niveles de leptina sintetizada principalmente por los adipocitos. Este dato indica que existe una reserva energética adecuada para mantener la función reproductiva normal; además, esta hormona ejerce una acción sobre la esteroidogénesis folicular y actúa en la regulación de la secreción de gonadotropinas hipofisarias (Boiti, 2004). En lo que se refiere al inicio de la foliculogénesis, algunos autores describen que comienza a partir de la pubertad en torno a los 65-90 días (Alvariño, 1993), mientras que otros puntualizan la existencia de oleadas foliculares en conejas prepúberes (Kennedy *et al.*, 2003; Hutt *et al.*, 2006). En esta especie, tanto los mecanismos de reclutamiento folicular como la regulación precisa de la foliculogénesis *in vivo* no son del todo conocidos. Por ello, el objetivo de este trabajo es revisar los conocimientos existentes, hasta el momento, sobre los procesos que regulan la dinámica folicular en esta especie.

Características foliculares en la coneja

Durante el desarrollo folicular se pueden definir cinco estadios morfológicos principales los cuales, a su vez, se pueden agrupar en relación al momento en el que se forma el antro folicular en folículos preantrales (primordiales, primarios y secundarios) y antrales (terciarios y preovulatorios).

1. *Folículo primordial* (figura 1.A.1). El oocito se encuentra rodeado de una capa de células planas conectadas entre sí y al oocito mediante las uniones 'gap' (en hendidura), las cuales permiten el intercambio de pequeñas moléculas, señales o nutrientes (Kidder y Mhawi, 2002; Kennedy *et al.*, 2003). El diámetro del folículo y del oocito en este estadio en la coneja es de 30-44 μm y 30 μm , respectivamente (Pincus y Enzmann, 1935; Hutt *et al.*, 2006). En la coneja, la matriz extracelular glicoproteica ZP₁ que compone la zona pelúcida, se encuentra entre el oocito y las células foliculares y aparece antes de que dichas células se transformen en cúbicas (Wolgemuth *et al.*, 1984). Esta relacionada con el inicio del crecimiento folicular y se produce tanto por el oocito como por las células de la granulosa que lo rodean (Lee, 2000; Hutt *et al.*, 2006). También se ha determinado la presencia de la glicoproteína responsable del reconocimiento gameto-oocito (ZP₃) en algunos folículos primordiales (Wasarman, 1989; Grootenhuis *et al.*, 1996).

2. *Folículo primario* (figura 1.B.2). El folículo tiene un diámetro de unos 100-120 μm (Pincus y Enzmann, 1935; Hutt *et al.*, 2006). Las células foliculares planas que rodean al oocito en crecimiento se transforman en una capa de células cúbicas. El oocito de la coneja experimenta un gran crecimiento llegando a medir 60 μm .

3. *Folículo secundario o preantral* (figura 1.C.3 y 1.D.3). El folículo mide 200 μm de diámetro medio (Pincus y Enzmann, 1935). Consta de un oocito que alcanza casi su

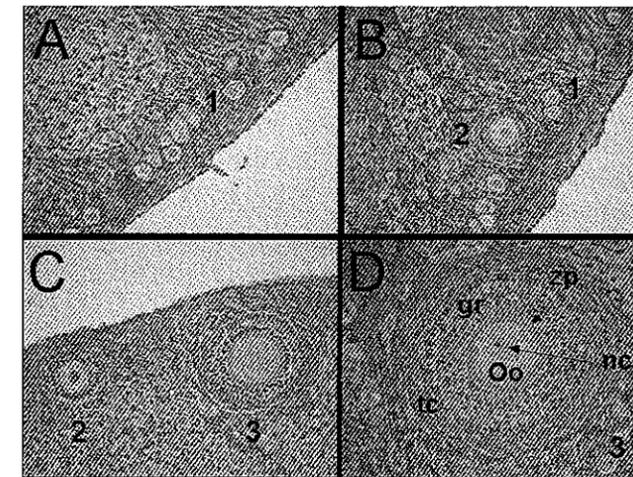


Figura 1. Desarrollo folicular preantral. A) 1) Folículos primordiales. 40x. Formados por un oocito rodeado de una capa de células planas. B) 2) Folículo primario. 40x. Formado por un oocito rodeado de una capa de células cúbicas de la granulosa. C) 3) Folículo secundario. 40x. El oocito se encuentra rodeado de dos o más capas de células de la granulosa, alrededor de las cuales se forma la teca. D) 3) Detalle de un folículo secundario. 40x: Oo: oocito, nc: núcleo del oocito, zp: zona pelúcida, gr: células de la granulosa, tc: células de la teca.

Figure 1. Preantral follicles. A) 1) Primordial follicles. 40x. Formed by an oocyte surrounded by one layer of squamous somatic cells. B) 2) Primary follicles. 40x. The oocyte is surrounded by a single layer of cuboidal granulosa cells. C) 3) Secondary follicle. 40x. The oocyte is surrounded by two or more layers of granulosa cells and the theca layer appears around them. D) 2) Secondary follicle. 40x. oo: oocyte, nc: oocyte nucleus, zp: zona pellucida, gr: granulosa cells, tc: theca cells

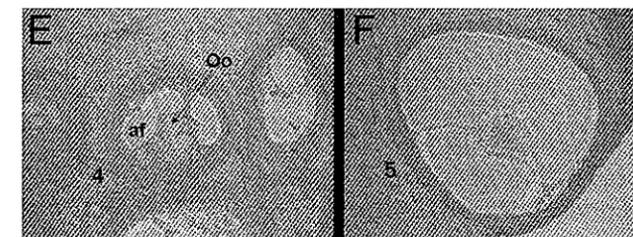


Figura 2. Desarrollo folicular antral. E) 4) Folículos terciarios o antrales. 10x. Antro folicular relleno de líquido folicular. Oo: oocito, af: antro folicular. F) 5) Folículo preovulatorio o de Graff. 10x. El aumento de tamaño es debido principalmente al gran acúmulo de líquido folicular.

Figure 2. Antral follicles. E) 4) Tertiary or antral follicles. 10x. With the formation of a fluid filled cavity, the antrum. Oo: oocyte, af: follicular antrum. F) 5) Preovulatory follicle. 10x. The follicular growth is due to antral fluid accumulation.

tamaño máximo (80-104 μm), con dos o más capas de células de la granulosa alrededor que se multiplican rápidamente; comienzan

a desarrollarse las células de la teca y su vascularización (Krandfelder *et al.*, 1984; Macchiarelli *et al.*, 1992).



4. *Folículo terciario o antral* (figura 2.E.4). Estos folículos en la coneja tienen un diámetro superior a 200-250 μm según distintos autores (Fleming et al., 1984; Krandfelder et al., 1984; Jelinkova et al., 1994; Hutt et al., 2006). Aparecen pequeños espacios rellenos de líquido folicular, producidos por el metabolismo de las células foliculares, los cuales van formando una cavidad llamada antro folicular. El oocito crece hasta unos 133-135 μm (Jelinkova et al., 1994) y presenta de seis a nueve capas de células de la granulosa (Alvaríño, 1993).

5. *Folículo preovulatorio o de Graff* (figura 2.F.5). En la coneja, estos folículos tienen un diámetro superior a 800-900 μm (Krandfelder et al., 1984) y el oocito mide entre 140-143 μm (Jelinkova et al., 1994). El antro aumenta de tamaño y acumula gran cantidad de factores de crecimiento, hormonas peptídicas y esteroideas, proteínas, metabolitos energéticos y otras muchas sustancias desconocidas (Sutton et al., 2003). Las células de la granulosa más externas contactan con la membrana basal; externamente a la misma se encuentran las células de la teca interna, con un gran número de capilares sanguíneos, y las células de la teca externa completamente formadas. Durante este periodo, el oocito apenas aumenta su tamaño (Pincus y Enzmann, 1935; Eppig, 2001) produciéndose el crecimiento de los folículos antrales principalmente por el acúmulo de líquido folicular (Bonhoff y Adams, 1985; Van der Hurk, 2005).

La morfología de los folículos es comparable entre especies sobre todo en las fases preantrales, aunque el tiempo total que dura la foliculogénesis varía enormemente entre unas y otras. Mientras que en especies de pequeño tamaño este proceso dura días (20 días en el ratón), en grandes especies como la oveja, la vaca y la mujer, este proceso dura desde semanas a meses (Sirard, 2001). En la coneja, según Mariana et al. (1989), el tiem-

po medio que tarda un folículo de aproximadamente 100 μm en alcanzar el tamaño preovulatorio de 950 μm es de 97 días.

Regulación endocrina de la foliculogénesis

El eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (HPO) está implicado en el control de la ovulación y el comportamiento sexual, mediante una serie de mecanismos de 'feedback' complejos, tanto hormonales como nerviosos. La secreción de GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotropina) por el hipotálamo estimula la síntesis y la liberación de hormonas gonadotropas por parte de la hipófisis anterior; la FSH, que favorece el crecimiento folicular, y la LH, que actúa sobre el periodo final del desarrollo folicular e induce la ovulación de los folículos preovulatorios. Las hormonas esteroideas (principalmente estrógenos y progesterona) secretadas por los folículos ejercen a su vez un 'feedback' positivo o negativo sobre la GnRH, FSH y LH (control de retroalimentación) (Theau-Clément, 2000). En la coneja, factores como el manejo, la nutrición y el entorno pueden generar diferentes estímulos auditivos, olfatorios, visuales y estresantes que generan señales neuromoduladoras, los cuales influyen en la secreción hormonal del eje HPO y permiten modificar positiva o negativamente los parámetros reproductivos (Theau-Clément, 2000; Boiti, 2004). En el desarrollo folicular están implicados una gran cantidad de factores endocrinos y paracrinos. Así, generalmente se pueden distinguir dos periodos en relación con la influencia que tienen las gonadotropinas hipofisaria LH y FSH:

a) Fase folicular no gonadotropo receptiva

Corresponde al desarrollo lento de los folículos preantrales (primordiales, primarios y secundarios), que parece ser independiente

de las gonadotropinas sistémicas FSH y LH; en este periodo prevalece la regulación intraovárica e intrafolicular debida a factores paracrinos y autocrinos. No obstante, se ha detectado la presencia de RNAm para el receptor de la FSH en folículos preantrales de diferentes especies como la oveja (Tisdall et al., 1995) o la mujer (Oktay et al., 1997). Esto induce a pensar que pudiera existir una posible acción de la FSH a nivel basal sobre el desarrollo de estos folículos y la competencia de sus oocitos (Van der Hurk et al., 1997; Eppig, 2001; Webb et al., 2003; Adriaens et al., 2004). Se ha demostrado que factores como BMPs (Proteínas Morfogénicas del Hueso), IGFs (Factores de Crecimiento similares a la Insulina), EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico), FGFs (Factores de Crecimiento Fibroblásticos), y la activina, entre otros, estimulan el crecimiento folicular induciendo la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa en este periodo (Van der Hurk, 2005). Aunque existen pocos estudios hasta el momento, trabajos efectuados *in vitro* sugieren que estos factores intraováricos ejercen acciones similares en la coneja (Lorenzo et al., 1996a).

b) Fase folicular gonadotropo receptiva

Para el desarrollo correcto de los folículos antrales (folículos terciarios y preovulatorios), es esencial la acción de la FSH y la LH. La acción de las gonadotropinas está a su vez modulada por factores de crecimiento locales y otras hormonas como la inhibina, la activina o la hormona del crecimiento (GH), que ejercen acciones más específicas sobre el oocito y las células foliculares (Van der Hurk, 2005). La FSH es uno de los agentes de supervivencia más importantes, ya que estimula la producción de factores de crecimiento como el EGF, TGF α (Factor de Crecimiento Transformante α), IGFs y, además, suprime la expresión de genes inductores de apoptosis

(Smits et al., 2001). En la coneja se requiere la integridad del folículo para ejercer su efecto antiapoptótico (Maillet et al., 2002).

Por otro lado, la acción de las gonadotropinas sobre la esteroidogénesis ovárica se lleva a cabo a través de receptores expresados en las células diana de los folículos. Las células de la teca expresan receptores para la LH, cuya unión desencadena la síntesis de precursores de estrógenos (androstenediona). Las células de la granulosa expresan receptores para la FSH y poseen actividad aromataasa, que cataliza la síntesis de 17- β estradiol a partir de la androstenediona procedente de la teca y estimulada por la acción de la FSH y de otros factores de crecimiento (Erickson y Ryan, 1975 y 1976). Por ello, los niveles de 17- β estradiol aumentan considerablemente a medida que aumenta el tamaño de los folículos (Lefèvre y Caillol, 1978). En la coneja la presencia de folículos en un estadio de desarrollo final, mayores de 850 μm , está relacionada indirectamente con el aumento en la producción de 17- β estradiol, y de la receptividad sexual (Lefèvre y Caillol, 1978; Molina et al., 1986). No obstante, un nivel plasmático de 17- β estradiol determinado no puede predecir con exactitud el nivel de receptividad sexual en esta especie (Rebollar et al., 1992), sobre todo en el periodo de lactación (Ubilla y Rebollar, 1995).

En relación con el reclutamiento y la selección folicular, según Fleming et al. (1984), el reclutamiento de un grupo de folículos en la coneja va precedido de un aumento agudo de FSH, al igual que en las especies cíclicas. De entre todos los folículos reclutados, la selección y el crecimiento de unos pocos folículos dominantes hasta el estado preovulatorio se lleva a cabo mediante la disminución progresiva de los niveles circulantes de FSH (Souza et al., 1996). Esto es debido al 'feedback' negativo que ejercen las concentraciones crecientes de 17- β estradiol (Duffy-Barbe et al., 1978; Turckheim et al., 1983) e

inhibina (Goodman, 1984; Pau et al., 2000) producidos por los folículos dominantes sobre la hipófisis. Estos folículos, a su vez, tienen una mayor concentración de IGF (Yoshimura et al., 1994) y folistatina. Esta última hormona inhibe la acción de la activina mediante su unión a ella y así, la activina no estimula la liberación de GnRH (Pau et al., 2000) e indirectamente inhibe la liberación de FSH de la hipófisis, lo que también contribuye a la disminución de dichos niveles (Webb et al., 2003; Van der Hurk, 2005). Por otro lado, estudios realizados *in vitro* en la coneja, demuestran que el IGF-I estimula la producción de 17- β estradiol, el desarrollo folicular y la maduración del oocito (Yoshimura et al., 1996; Lorenzo et al., 1997). El IGF y la FSH aumentan de forma sinérgica la respuesta folicular a las gonadotropinas, la actividad aromatasasa (Webb et al., 2003) y la expresión de receptores de LH en las células de la granulosa (Van der Hurk, 2005). Esto último permite a los folículos dominantes utilizar la LH para continuar su crecimiento, aún cuando las concentraciones de FSH circulantes sean bajas. La LH, por lo tanto, es la hormona predominante en la fase de dominancia, que favorece el desarrollo de los folículos al final de la foliculogénesis (Smits et al., 2001; Webb et al., 2003). Así, Krandfelder et al. (1984) muestran como la estimulación ovárica con hCG (Gonadotropina Coriónica humana), que es una hormona de acción similar a la LH, favorece el desarrollo folicular final, apareciendo un mayor número de folículos de mayor diámetro o preovulatorios. En este sentido, antes de la aplicación de hCG exógena, la mayoría de los folículos antrales que se observan en el ovario de la coneja no superan el diámetro de 700 μ m. Todo ello contribuye al distanciamiento en el tamaño de los folículos dominantes seleccionados respecto a los subordinados. Asimismo, los primeros ejercerían estímulos inhibitorios intraováricos sobre los segundos que conducirían a la atresia de aquellos que

tienen un diámetro alrededor de 700 μ m (Krandfelder et al., 1984). Sin embargo, los mecanismos de dominancia y cómo influyen en el número final de folículos preovulatorios no están del todo explicados en la coneja. En este sentido, estudios llevados a cabo por Yoshimura et al. (1994) en condiciones *in vitro* establecen que la Hormona del Crecimiento (GH) también juega un papel importante sobre la selección, la maduración de los oocitos y el proceso de ovulación en el ovario de la coneja. En ausencia de gonadotropinas, la GH estimula el desarrollo folicular y el reinicio de la meiosis en los complejos cúmulo oocito (COC), directamente mediante su unión a receptores de GH presentes en los folículos y en los oocitos de la coneja (Lorenzo et al., 2006) o indirectamente a través de la estimulación de IGF-I.

Desarrollo del oocito durante la foliculogénesis

El paso previo a la ovulación del oocito consiste en una capacidad para reducir su material genético a la mitad mediante la meiosis, dando lugar a dos células hijas haploides: el oocito propiamente dicho, que conserva casi la totalidad del citoplasma, y el corpúsculo polar. En la coneja, la meiosis comienza en el periodo postnatal. Al nacimiento, los gametos que hay en los ovarios son oogonias diploides, que, a partir del día 1, inician progresivamente la meiosis (Peters et al., 1965). La mayoría, pasadas dos o tres semanas de edad, se habrán transformado en oocitos en estadio de diplotene de la profase I (Peters et al., 1965). En condiciones normales, los oocitos permanecen quiescentes y mantienen esta configuración nuclear, llamada vesícula germinal por poseer un núcleo prominente, hasta pocas horas antes de la ovulación. Sin embargo, a lo largo de la foliculogénesis, los oocitos se desarrollan

a nivel citoplasmático, y sintetizan y almacenan, macromoléculas, proteínas y RNA mensajero, a lo que se debe su aumento de tamaño (Motlik et al., 1989; Hyttel et al., 1997; Leibfried-Rutledge, 1999). El pico preovulatorio de la LH desencadena el reinicio de la meiosis que progresa hasta el estadio de metafase II con la extrusión del primer corpúsculo polar (periodo conocido como maduración nuclear del oocito). A su vez, en el citoplasma se produce una redistribución de diferentes orgánulos, como las mitocondrias y los gránulos corticales, proceso referido como maduración citoplasmática (Assey et al., 1994; Sirard, 2001). Tanto ésta como la maduración nuclear son la culminación del progresivo desarrollo del oocito desde el inicio de la foliculogénesis y a lo largo de ella hasta la ovulación (Hyttel et al., 1997). En la coneja, según Jelinkova et al. (1994), la mayoría de los folículos menores de 1 mm de diámetro contienen oocitos que no son competentes para llevar a cabo adecuadamente procesos de desarrollo posteriores. Por lo tanto, la competencia del oocito aumentará, por lo general, con el tamaño del mismo y el diámetro folicular debido a que ha acumulado el material e instrucciones necesarias durante la foliculogénesis para llevar a cabo estos procesos con éxito (Leibfried-Rutledge, 1999; Van der Hurk, 2005). De hecho, los resultados de maduración *in vitro* mejoran cuando se utilizan aquellos oocitos que se encuentran dentro de folículos superiores a 1 mm y se realiza una selección de los oocitos basada en criterios morfológicos (Lorenzo et al., 1996b). A pesar de esto, los resultados expresados en porcentajes de blastocistos obtenidos *in vitro* a partir de oocitos procedentes de folículos antrales, son menores que los obtenidos *in vivo*. Esto probablemente sea debido, entre otros factores, a que los oocitos de los folículos dominantes al final de la foliculogénesis además presentan una serie de modificaciones ultraestruc-

turales fundamentales que les confieren la competencia o capacitación final adecuada para continuar su desarrollo óptimo posterior (Van der Hurk, 2005).

Comunicación oocito- cúmulo

Hasta la pasada década, se consideró que el papel del oocito en el control de la foliculogénesis era fundamentalmente pasivo. Sin embargo, hoy en día se sabe que para el correcto desarrollo tanto del oocito como de las células que lo rodean durante la foliculogénesis y, también, durante el proceso de maduración posterior, es esencial el intercambio bidireccional de una gran cantidad de señales entre ambos a través de las uniones 'gap' (Kidder y Mhawi, 2002), como son nutrientes, precursores metabólicos, hormonas y factores de crecimiento. Todos ellos ejercen estímulos tanto positivos como negativos (Van der Hurk, 2005). Así, el oocito controla la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, aumenta su respuesta a las gonadotropinas, influye en la esteroidogénesis, favorece la diferenciación de las células de la teca y la expansión del cúmulo durante la ovulación (revisado por Lorenzo et al., 1997). Por su parte, las células del cúmulo son indispensables para el crecimiento y la maduración (Lorenzo et al., 1996 a y b), así como para la actividad transcripcional del oocito durante la foliculogénesis (Eppig, 2001).

La ovulación y la actividad ovárica en la coneja

La coneja presenta características reproductivas diferentes a las otras especies, derivadas de la ausencia de un ciclo estral definido y regular, ya que más que por el 'feedback'

positivo de los estrógenos, la ovulación es inducida por el coito. Éste genera un reflejo neuroendocrino que aumenta el tono noradrenérgico, lo que estimula la liberación de GnRH del hipotálamo (Pau y Spies, 1986; Kaynard et al., 1990), aumentando la pulsabilidad de la LH que alcanza su nivel máximo entre una hora y media y dos horas después (Mills y Gerardot, 1984; Pau et al., 2000). Posteriormente, vuelve a sus niveles basales a las 4-5 horas, coincidiendo con los niveles máximos de 17- α hidroxiprogesterona producida por el folículo (Waterson y Mills, 1976). Se ha sugerido que esta hormona facilita la descarga de LH después del coito y que, a su vez, activaría la síntesis de 17- α hidroxiprogesterona. Según Pau et al. (2000), otros factores ováricos, además del 17- β estradiol y la 17- α hidroxiprogesterona, pueden estar implicados en esta función ya que, tras el coito, conejas ovariectomizadas tratadas con estas hormonas de forma crónica no desarrollan un pico de LH tan pronunciado como las conejas no ovariectomizadas. Por otro lado, después del coito, se genera un aumento transitorio de FSH a los 60-90 minutos (Kaynard et al., 1990; Pau et al., 2000), un aumento de esteroides foliculares (Lefèvre y Caillol, 1978) y de la síntesis de proteínas y RNAm (Mills, 1975), que vuelven a sus valores basales en el momento de la ovulación. Ésta se produce a las diez o doce horas del pico de LH (Hilliard et al., 1967; Díaz et al., 1987), por lo que entran en atresia aquellos folículos antrales con un diámetro superior a 600 μ m que no hayan ovulado (Krandfelder et al., 1984). Según Osteen y Mills. (1980), en conejas a las que se induce la ovulación con hCG se produce un segundo pico de FSH a las 24-48 horas. Ello es responsable de estimular el reemplazamiento folicular, dando lugar a los 6 días a una nueva población de folículos preovulatorios. Sin embargo, según Krandfelder et al. (1984), a las 40-50 horas del pico de LH aparecen de nuevo folículos preovu-

lutorios en el ovario de la coneja, de diámetro superior a 900 μ m, preparados para una posible ovulación en el caso de que en la anterior no se haya producido la gestación. Si no se produce el coito, las oleadas de folículos se desarrollan y regresan en intervalos de 7 a 10 días bajo la acción tónica de la FSH (revisado por Boiti, 2004), ya que la supervivencia de los folículos preovulatorios en la coneja sería de 7-10 días (Hill y White, 1933). Sin embargo, los estudios de dinámica folicular muestran resultados variables, según las condiciones experimentales en las que se llevan a cabo y el estado fisiológico reproductivo de las hembras utilizadas.

En cuanto al periodo postparto, Díaz et al. (1987) señalan que aparece una primera oleada de crecimiento folicular al final de la gestación, coincidiendo con la caída de los niveles de progesterona circulantes en los días 29 y 30 de la misma. En este periodo, el desarrollo folicular tiene una ciclicidad de 10 a 12 días aproximadamente, coincidiendo con un tamaño folicular de 450 μ m, hasta que llegan al estadio preovulatorio (diámetro folicular > 1,5 mm). Esto supone que los ciclos se superponen parcialmente cada 4 a 6 días. De este modo, mientras los folículos de un ciclo se encuentran en estado preovulatorio, antes de su regresión, comienza el crecimiento de los folículos de la oleada siguiente. Según estos autores, estas oleadas alcanzan su máximo desarrollo en torno al día 3 y 9 post-parto; por ello, el comportamiento sexual de las conejas no es igual en todo el periodo post-parto (Ubilla y Rebollar, 1995).

Control de la reproducción

En las granjas de producción cunícula, la coneja soporta periodos de lactación y gestación simultáneos que merman sus reservas energéticas y su condición corporal, incrementando los intervalos entre partos y aumentan-

do el número de inseminaciones necesarias para obtener una gestación (Rebollar et al., 2006; Fortun-Lamothe, 2006). Además, durante la lactación, los niveles de prolactina circulantes son elevados en respuesta a la succión de los gazapos siendo indispensable para el mantenimiento de la lactogénesis. Sin embargo, la hiperprolactinemia ejerce un efecto antagonista sobre la función reproductiva de la coneja. Esto es debido a que, esta hormona afecta a los mecanismos relacionados con el desarrollo folicular y la esteroidogénesis ovárica que, en definitiva, determinan una receptividad sexual, fertilidad y prolificidad inferior en las conejas lactantes (Ubilla et al., 2000). En este sentido, Rodríguez et al. (1989), observaron una menor respuesta de la LH a la GnRH en conejas con baja receptividad sexual, como resultado a una posible disminución en la sensibilidad de la hipófisis a esta hormona. Por esto, se utilizan estrategias reproductivas y nutricionales que permiten, por un lado, inducir y sincronizar el celo en las conejas lactantes de forma efectiva y, por otro, paliar el déficit energético. El ovario es el órgano diana sobre el que en última instancia actúan estas estrategias y cuya respuesta a los cambios endocrinos ocurridos puede englobarse un gran número de procesos relacionados con el grado de maduración de los folículos y de sus oocitos antes de la ovulación y la fecundación. Gracias al conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo folicular y de los factores que lo regulan, se han introducido sistemas de sincronización de celo que han mejorado la productividad de las granjas comerciales. Para ello, se han empleado hormonas como eCG (Gonadotropina Coriónica equina), de acción similar a la FSH (70%) y a la LH (30%), para estimular el crecimiento y el desarrollo folicular. Así mismo, con la introducción de técnicas de inseminación artificial ha sido necesario inducir la ovulación en las conejas mediante la administración de hormonas de acción similar a la LH,

como son los análogos sintéticos de GnRH y la hCG. Otros métodos de sincronización de celo, desarrollados más recientemente, están basados en el control de diversos sistemas de manejo o bioestimulación, como la separación transitoria de la camada previa a la inseminación artificial, para reducir los niveles de prolactina que interfieren con el desarrollo folicular evitando así el uso de hormonas exógenas. Este manejo ha demostrado que mejora los parámetros reproductivos en conejas lactantes (Alvariño et al., 1998; Theau-Clément, 2000; Rebollar et al., 2006).

Como conclusión se puede establecer, en base a los diferentes estudios, que el conocimiento de la fisiología de la reproducción es fundamental para mejorar los parámetros reproductivos sobre todo en conejas sometidas a ritmos intensivos de producción, y para aumentar los rendimientos económicos de una granja cunícola. Por otro lado, el conocimiento de los mecanismos reguladores de la foliculogénesis es de gran importancia para mejorar los futuros sistemas de desarrollo folicular *in vitro*, dentro de las técnicas de reproducción asistida (ART) que utilizan a la coneja como biomodelo. Por lo tanto, el estudio de sistemas de desarrollo folicular *in vitro* permitiría utilizar no solo los oocitos de folículos antrales, sino los primordiales y primarios, más difíciles de manipular pero de gran importancia, al ser la fuente del potencial reproductivo de cualquier especie, sobre todo en aquellas de alta calidad genética.

Agradecimientos

María Arias Álvarez es becaria predoctoral de la Comunidad de Madrid (Consejería de Educación y Fondo Social Europeo). Rosa María García García, es investigadora del programa Juan de la Cierva del MEC (Ministerio de Educación y Ciencia).

Bibliografía

- Adriaens I, Cortvrindt R, Smith J, 2004. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects of folliculogenesis and developmental oocyte competence. *Human Reprod.* 19(2): 398-408.
- Alvariño JMR, 1993. Control de la reproducción en el conejo, pp. 48-114. Alvariño JMR, MAPA (Eds.). Mundi-Prensa, España.
- Alvariño JM, Del Arco JA, Bueno A, 1998. Effect of mother-litter separation on reproductive performance of lactating rabbit females inseminated on day 4 or 11 post partum. *World Rabbit Sci.* 6(1): 191-194.
- Assey RJ, Hyttel P, Greve T, Purwantara B, 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 37: 335-344.
- Boiti C, 2004. Underlying physiological mechanism controlling the reproductive axis of rabbit does. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, 186-206, Puebla (Méjico).*
- Bonhoff AJ, Adams CE, 1985. Relationship of hormonally induced developmental changes in preovulatory follicles of the rabbit. *Lab. Anim.* 19: 27-31.
- Díaz P, Rodríguez JM, Gosálvez LF, Román MR, 1987. Cyclic ovarian activity in post-partum rabbits. *J. Appl. Rabbit Res.* 10: 122-125.
- Díaz P, 1987. Actividad reproductiva de la coneja doméstica en torno a la pubertad. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.
- Dufy-Barbe L, Dufy B, Vicent JD, 1978. Serum gonadotrophin levels in the ovariectomized rabbit: Effect of acute and chronic administration of estradiol. *Biol. Reprod.* 18: 118-124.
- Eppig J, 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction.* 122: 829-838.
- Erickson GF, Ryan KJ, 1975. The effect of LH/FSH, dibutyryl cyclic AMP, and prostaglandins on the production of estrogens by rabbit granulosa cells in vitro. *Endocrinology.* 97: 108-113.
- Erickson GF, Ryan KJ, 1976. Stimulation of testosterone production in isolated rabbit testis tissue by LH/FSH, dibutyryl cyclic AMP, PGF_{2a} and PGE₂. *Endocrinology.* 99: 452-458.
- Fleming MW, Rhodes RC, Dailey RA, 1984. Compensatory responses after unilateral ovariectomy in rabbits. *Biol. Reprod.* 30: 82-86.
- Fortun-Lamothe L, 2006. Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 1-15.
- Goodman AL, 1984. In vitro evidence of a role for inhibin in female rabbits. *Am. J. Physiol.* 246: 243-248.
- Grootenhuys AJ, Philipsen HLA, de Breet-Grijpsbach JTM, van Duin M, 1996. Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey and human ovaries using antibodies against human ZP3. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 50: 43-54.
- Hill M, White WE, 1933. The growth and regression of follicles in the oestrus rabbits. *J. Physiol. (London).* 80: 174-178.
- Hilliard J, Penardi R, Sawyer CH, 1967. A functional role for 20 α -Hydroxypregn-4-en-3-one in the rabbit. *Endocrinology.* 80: 901-909.
- Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK, 2006. Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell. Tissue Res.* 326(3): 809-822.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T, 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology.* 47: 23-32.
- Jelinkova L, Kubelka M, Motlik J, Guerrier P, 1994. Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbits oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 37: 210-215.
- Kaynard AH, Pau KYF, Hess DL, Spies HG, 1990. Gonadotrophin-Releasing Hormone and Norepinephrine release from the rabbit mediobasal and anterior hypothalamus during the mating-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology.* 127(3): 1176-1185.
- Kennedy KL, Floyd AA, Clarkson AM, Lee VH, 2003. Epidermal growth factor regulation of connexin 43 in cultured granulosa cells from preantral rabbit follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 64: 61-69.
- Kidder GM, Mhawi AA, 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction.* 123: 613-620.
- Kranzfelder D, Korr H, Mestwerdt W, Maurer-Schulze B, 1984. Follicle growth in the ovary of the rabbit after ovulation-inducing application of human chorionic gonadotropin. *Cell. Tissue Res.* 238: 611-620.
- Lee VH, 2000. Expression of rabbit zona pellucida-1 messenger ribonucleic acid during early follicular development. *Biol. Reprod.* 63: 401-408.
- Lefèvre B, Caillol M, 1978. Relationship of oestrus behaviour with follicular growth and sex steroid concentration in the follicular fluid in the domestic rabbit. *Anim. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18(6): 1435-1441.
- Leibfried-Rutledge ML, 1999. Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology.* 51: 473-485.
- Lorenzo PL, Rebollar PG, Illera MJ, Illera JC, Illera M, Alvariño JM, 1996a. Stimulatory effect of insulin-like growth factor I and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 107(1): 109-107.
- Lorenzo PL, Rebollar PG, Illera MJ, Illera JC, Illera M, Alvariño JMR, 1996b. Characterization of rabbit follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Arch. Zootec.* 45: 25-35.
- Lorenzo PL, Illera JC, Silván G, Munro CJ, Illera MJ, Illera M, 1997. Steroid-level response to insulin-like growth factor I in oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Immunol.* 35(1): 11-29.
- Lorenzo PL, Bonanno A, Arias-Álvarez M, López-Béjar M, Rebollar PG, 2006. Estudio preeliminar sobre las características inmunohistoquímicas e histológicas ováricas de conejas sincronizadas. XXXI Symposium de cunicultura, 15-21, Lorca (España).
- Macchiarelli G, Viza E, Nottola SA, Familiari G, Motta PM, 1992. Cellular and microvascular changes of the ovarian follicle during folliculogenesis; a scanning electro microscopic study. *Arch. Citol. Histol.* 55: 191-204.
- Maillet G, Bred E, Benhaim A, Leymarie P, Féral C, 2002. Hormonal regulation of apoptosis in rabbit granulosa cells in vitro: evaluation by flow cytometric detection of plasma membrane phosphatidylserine externalization. *Reproduction.* 123: 243-251.
- Mariana JC, Hulot F, Drevin C, Tomassone R, Poudjardieu B, 1989. Estimation de la durée moyenne de croissance d'un follicule d'ovaire de lapine âgée de 20 semaines, dans deux souches. *Archiv. Biol.* 100: 47-63.
- Mills TM, 1975. Protein and RNA synthesis in follicles isolated from rabbit ovaries. *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine.* 148: 995-1000.
- Mills TM, Gerardot RJ, 1984. Dissociation of copulation from ovulation in pregnant rabbits. *Biol. Reprod.* 30: 1243-1252.
- Molina I, Pla M, García F, 1986. Poblaciones de folículos antrales en función del comportamiento de monta en conejas: utilización de un método simple para la medición de folículos. *ITEA* 66: 21-26.
- Motlik J, Fulka Jr J, Procházka R, Rimkevícova Z, Kubelka M, Fulka J, 1989. RNA and protein synthesis requirements for the resumption of meiosis in rabbit oocytes: the role of cumulus cells. *Reprod. Nutr. Dev.* 29: 601-609.
- Oktay K, Briggs D, Gosden RG, 1997. Ontogeny of follicle stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(11): 3748-51.
- Osteen KG, Mills TM, 1980. Changes in the size, distribution and steroid content of rabbit ovarian follicles during early pseudopregnancy. *Biol. Reprod.* 22: 1040-1046.
- Pau KY, Spies HG, 1986. Estrogen-dependent effects of norepinephrine on hypothalamic Gonadotrophin-Releasing Hormone release in rabbit. *Brain Res.* 399(1): 15-23.
- Pau CY, Pau KY, Berria M, Spies H, 2000. Ovarian influence on gonadotropin and prolactin release in mated rabbits. *Endocrine.* 13(1): 25-35.

- Peters H, Levy E, Crone M, 1965. Oogenesis in rabbit. *J. Exp. Zool.* 158: 169-180.
- Pincus G, Enzmann EV, 1935. The growth, maturation and atresia of ovarian eggs in the rabbit. *J. Physiol.* 61: 351-382.
- Rebollar PG, Ubilla E, Alvariño JC, Illera JC, Silván G, 1992. Influencia del nivel de receptividad sexual sobre el estradiol plasmático y la respuesta ovulatoria durante el postparto en la coneja. *Rev. Esp. Fisiol.* 48(1): 13-18.
- Rebollar PG, Milanés A, Pereda N, Millán P, Cano P, Esquifino AI, Villaroel M, Silván G, Lorenzo PL, 2006. Oestrus synchronization of rabbit does at early post-partum by doe-litter separation or ECG injection: Reproductive parameters and endocrine profiles. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 218-256.
- Rodríguez JM, Agrasal C, Esquifino A, 1989. Influence of sexual receptivity on LH, FSH and prolactin release after GnRH administration in female rabbits. *Anim. Reprod. Sci.* 20: 57-65.
- Sawyer RH, Smith P, Heath AD, Juengel JL, Wakefield J, McNatty KP, 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol. Reprod.* 66: 1134-1150.
- Sirard MA, 2001. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55: 1241-1254.
- Smitz J, Nogueira D, Albano C, Cortvrindt R, Devroey P, 2001. Improving in vitro maturation of oocytes in the human taking lessons from experiences in animal species. *Reprod. Dom. Anim.* 36: 11-17.
- Souza CJH, Campbel BK, Baird DT, 1996. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *J. Reprod. Fertil.* 108: 101-106.
- Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG, 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum. Reprod. Update.* 9(1): 35-48.
- Theau-Clément M, 2000. Advances in biostimulation methods applied to rabbit reproduction. 7th World Rabbit Congress, 61-79, Valencia, (España).
- Tisdall DJ, Watanabe K, Hudson NL, Smith P, McNatty KP, 1995. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J. Mol. Endocrinol.* 15: 273-281.
- Turckheim M, Berger M, Jean-Faucher CH, Veysièrre G, Jean CL, 1983. Changes in ovarian oestrogens and in plasma gonadotropins in female rabbits from birth to adulthood. *Acta Endocrinol.* 103: 125-130.
- Ubilla E, Rebollar PG, 1995. Influence of the postpartum day on plasma estradiol-17b levels, sexual behaviour and conception rate, in artificially inseminated lactating rabbits. *Anim. Reprod. Sci.* 38: 337-344.
- Ubilla E, Rebollar PG, Pazo D, Esquifino AI, Alvariño JM, 2000. Pituitary and ovarian response to transient doe-litters separation in nursing rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 118: 361-366.
- Van der Hurk R, Bevers MM, Beckers JF, 1997. In-vivo and In-vitro development of preantral follicles. *Theriogenology.* 47: 73-82.
- Van der Hurk R, 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology.* 63: 1717-1751.
- Wassarman, 1989. La fecundación en los mamíferos. *Investigación y ciencia.* 149: 48-55.
- Waterson JW, Mils TM, 1976. Peripheral blood steroid concentrations in the preovulatory rabbits. *J. Steroid. Biochem.* 7: 15-17.
- Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG, 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod. Suppl.* 61: 71-90.
- Wolgemuth DJ, Celenza J, Bundman DS, Dunbar BS, 1984. Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. *Dev. Biol.* 106: 1-14.
- Yoshimura Y, Nagamatsu S, Ando M, Iwashita M, Oda T, Katsumata Y, Shiokawa S, Nakamura Y, 1996. Insulin-like growth factor binding pro-

- tein-3 inhibits gonadotropin-induced ovulation, oocyte maturation, and steroidogenesis in rabbit ovary. *Endocrinology.* 137(2): 438-46.
- Yoshimura Y, Iwashita M, Karube M, Oda T, Akiba M, Shiokawa S, Ando M, Yoshinaga A, 1994. Growth hormone stimulates follicular development by stimulating ovarian production of insulin-like growth factor-I. *Endocrinology.* 135(3): 887-94.
- (Aceptado para publicación el 21 de mayo de 2007)