

# La estimulación olfatoria en conejas jóvenes con secreciones de glándulas cutáneas de conejo macho induce crecimiento ovárico

## Olfactory stimulation in young rabbits with male rabbit skin gland secretion induces ovarian growth

José Alfonso Banda Herrera<sup>a</sup>, Mario Pérez-Martínez<sup>a\*</sup>

### Abstract:

Rabbit breeders need to have non-invasive natural methods that facilitate the reproductive management of this species. This study aimed to evaluate the effect of olfactory stimulation with secretions from male rabbit skin glands on the morphological development of ovarian follicles in female rabbits kept under farm conditions. For this purpose, New Zealand rabbits were used, and four groups of different ages were formed (9, 12, 15 and 18 weeks). The stimulant to the females was applied through the olfactory route from secretions obtained from the skin of adult male rabbits' submandibular and inguinal regions. The experiment was concluded in histological sections, and measurements were made of the ovarian follicles. A difference was found in the diameter of the ovarian follicles in the stimulated females of the 9 to 11 and 12-to-14-week groups concerning the unstimulated ones ( $P \leq 0.05$  and  $P \leq 0.001$ , respectively). From the results obtained, it is concluded that the olfactory stimulation scheme promoted ovarian follicle development. These results confirm the importance of the olfactory pathway in the ovarian development of young rabbits and constitute evidence of the feasibility of the practical use of cutaneous glandular secretions in managing the rabbit's ovarian cycle under farm conditions.

### Keywords:

Rabbit, olfactory bio stimulation, skin secretions, ovarian follicles

### Resumen:

Los cunicultores necesitan disponer de métodos naturales no invasivos que faciliten el manejo reproductivo de esta especie. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del estímulo olfatorio con secreciones de glándulas cutáneas de conejos macho sobre el desarrollo morfológico de los folículos ováricos de conejas mantenidas en condiciones de granja. Con este propósito se utilizaron conejas Nueva Zelanda con las que se formaron cuatro grupos de distintas edades (9, 12, 15 y 18 semanas). El estímulo a las hembras se dio por vía olfatoria, a partir de secreciones obtenidas de la piel de la región submandibular e inguinal de conejos adultos machos. Concluido el experimento en cortes histológicos, se realizaron mediciones a los folículos ováricos. Se encontró diferencia en el diámetro de los folículos ováricos en las hembras estimuladas de los grupos de 9 a 11 y de 12 a 14 semanas con respecto a las no estimuladas ( $P \leq 0.05$  y  $P \leq 0.001$ , respectivamente). A partir de los resultados obtenidos se concluye que el esquema de estimulación olfatoria utilizado promovió el desarrollo de los folículos ováricos. Estos resultados confirman la importancia de la vía olfatoria en el desarrollo ovárico de conejas jóvenes y constituyen una evidencia sobre la viabilidad del uso práctico de las secreciones glandulares cutáneas en el manejo del ciclo ovárico de esta especie en condiciones de granja.

### Palabras Clave:

Conejo, bio-estimulación olfatoria, secreciones cutáneas, folículos ováricos

## 1. Introducción

La piel está provista de glándulas sudoríparas apocrinas y sebáceas [1]. Estas glándulas secretan sustancias odoríferas que son clave en la comunicación olfatoria entre individuos. Se ha demostrado que existe una relación directa entre las

hormonas y la piel con sus anexos, como las glándulas sudoríparas y sebáceas [2]. Las glándulas submandibulares del conejo provienen de las glándulas sudoríparas y excretan compuestos aromáticos volátiles con los que impregna individuos de su grupo social y objetos presentes en su entorno,

<sup>a</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, José Alfonso Banda-Herrera, Mario Pérez-Martínez, Email: perezmtzmario@hotmail.com sitioweb@uaeh.edu.mx

Fecha de recepción: 06/07/2024, Fecha de aceptación: 12/05/2024, Fecha de publicación: 05/07/2024

esta conducta es conocida como marcaje por "frotamiento del mentón" [3].

Se sabe que el desarrollo y función excretora de las glándulas submandibulares depende de la acción de las hormonas sexuales [4].

El conejo presenta glándulas inguinales que se localizan a cada lado del ano y pene y están constituidas de una porción secretora sebácea superficial y otra sudorípara más profunda [5]. Las secreciones combinadas de ambas porciones anatómicas adquieren el aspecto de una cera de color pardo que es muy olorosa y se acumulan en los pliegues de la piel de la región inguinal.

Las feromonas sexuales funcionan como estímulos quimiosensoriales y contienen información referente al sexo y estado reproductivo de los individuos por lo que influyen en el comportamiento del macho y de la hembra. Este mensaje es captado por una estructura especializada llamada órgano vomeronasal [6]. Al respecto, en un estudio realizado en la zarigüeya (*Monodelphis domestica*) se informó que una feromona masculina de esta especie es capaz de inducir el desarrollo folicular ovárico y el crecimiento corporal en hembras jóvenes [7].

Al inicio de la pubertad en la coneja ocurre el reclutamiento de los folículos primordiales en la primera oleada de la foliculogénesis y los folículos con mayor desarrollo alcanzan un diámetro mayor [8].

En la cunicultura actual existe la necesidad de disponer de métodos alternativos naturales de fácil aplicación y de bajo costo para llevar a cabo el manejo del ciclo reproductivo de la hembra con el fin de sincronizar el momento de la cópula o de la inseminación artificial, evitando así, el uso de hormonas exógenas. Con base en este planteamiento el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la estimulación olfatoria en conejas jóvenes con secreciones de las glándulas cutáneas de conejo macho sobre la morfometría de los folículos ováricos de conejas jóvenes.

## 2. Materiales y métodos

Todos los procedimientos de manejo, cuidado y uso de los animales utilizados en el presente estudio fueron evaluados y aprobados por el Subcomité institucional para el cuidado y uso de animales experimentales (SICUAE-FMVZ-UNAM, MC-2015-1-02) [9].

Una semana previa al inicio del experimento, todos los animales tuvieron un período de aclimatación a las condiciones de alojamiento y de manejo de la granja. Durante el desarrollo del experimento se suministró a todos los animales alimento concentrado balanceado comercial en pellet y agua *ad libitum*. Se utilizaron conejas Nueva Zelanda blancas alojadas en jaulas individuales. A partir de estos animales se formaron de manera aleatoria cuatro grupos de 9, 12, 15 y 18 semanas de edad (n=4/grupo) que fueron estimulados por vía olfatoria con secreciones de glándulas cutáneas. Para cada grupo hubo un grupo control (n=4/grupo) que no recibió estímulo con secreciones.

Las secreciones glandulares cutáneas se obtuvieron a partir de conejos machos adultos Nueva Zelanda (n=3) por frotamiento de la piel de la región submandibular e inguinal con hisopos estériles [10]. Para la obtención de la secreción de las glándulas submandibulares de los machos, previamente se rasuró la región del mentón en un área aproximada de 2 cm<sup>2</sup> con una rasuradora eléctrica, previa tranquilización con acepromacina (1 mg/Kg) por vía intramuscular. Las secreciones de las glándulas inguinales se obtuvieron a partir de los pliegues de la piel de la región inguinal.

Cada uno de los hisopos impregnados con las secreciones de ambas glándulas se guardó en un tubo de vidrio estéril con tapa de rosca y se mantuvo a 4° C hasta su utilización. El estímulo olfatorio consistió en dar a oler a las hembras durante tres semanas, cada tercer día, en sesiones de cinco minutos, hisopos impregnados con las secreciones glandulares a una distancia de dos centímetros de las fosas nasales. A las hembras del grupo testigo se les dio a oler hisopos solo humedecidos con agua destilada durante el mismo tiempo y frecuencia. Al concluir el esquema de estimulación olfatoria programado, se dio muerte humanitaria a las hembras por un método eutanásico. Con este fin se les administró una sobredosis de pentobarbital sódico (90 mg/kg) por vía intracardiaca, previa tranquilización con acepromacina (1 mg/kg) por vía intramuscular (NOM-062-ZOO-1999) [11].

Confirmada la muerte se obtuvieron de inmediato los ovarios y se mantuvieron en solución fijadora de formalina amortiguada al 10% cuando menos durante 96 horas. Una vez fijados se obtuvieron fragmentos del tejido y procesaron por medio del método de inclusión en parafina con un procesador automático y se hicieron cortes en rebanada semi-seriados con un micrótomos de 6 µm de grosor que fueron teñidos con hematoxilina-eosina y algunos con la tinción tricrómica de Gomori. A continuación, con un microscopio óptico (Motic BA310®) conectado a una cámara de microscopía

digital (Moticam 2300®) a partir de las preparaciones histológicas se seleccionaron y capturaron campos microscópicos con presencia de folículos antrales que se clasificaron en pequeños (FAP) y grandes (FAG), dependiendo de la extensión que ocupaban en la zona cortical y medular de los ovarios derecho e izquierdo [12]. Para este fin, los FAP se encontraban localizados solo en la zona cortical del ovario y los FAG ocupaban la zona cortical y se extendían a una parte de la zona medular ovárica.

A partir de los campos microscópicos capturados del tejido de ambos ovarios se midió el diámetro de los FAP (n=10) y de los FAG (n=10) con el objetivo 10X de un microscopio óptico (Motic BA310®) conectado a una cámara de microscopía digital (Moticam 2300®). Las mediciones se realizaron con un software para análisis de imágenes (Motic Images Plus® versión 2.0).

Para comparar las mediciones entre los grupos de las distintas edades tanto en los FAP y los FAG del ovario derecho e izquierdo, con respecto a su grupo control, se utilizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis y de múltiples comparaciones de Dunn [13]. Los valores de \*P≤0.05, \*\*P≤0.01, \*\*\*P≤0.001 se consideraron estadísticamente significativos.

### 3. Resultados

Con relación al diámetro de los folículos antrales pequeños (FAP) del ovario izquierdo, solo hubo diferencias significativas entre el grupo tratado y control de los animales de 9 a 11 semanas de edad (P≤0.05). En los tres grupos restantes de mayor edad no se encontraron diferencias significativas. (Figura 1). Por otra parte, en el ovario derecho solo en el grupo de hembras de 12 a 14 semanas de edad hubo diferencias significativas, siendo mayor el diámetro de los folículos del grupo de hembras tratadas que del grupo control (P≤0.001). En los demás grupos de diferentes edades no se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado con respecto al grupo control correspondiente (P≥0.05). (Figura 1).

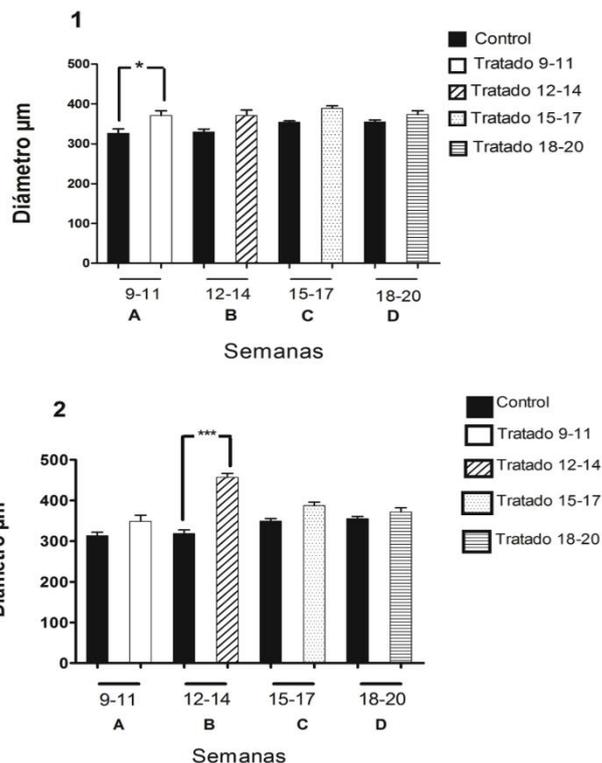


Figura 1. (1) Diámetro ( $\bar{x} \pm$  Error Estándar) de folículos antrales pequeños (FAP) de ovario izquierdo (1) y de ovario derecho (2) de conejas de diferentes edades. A (9-11 semanas), B (12-14 semanas), C (15-17 semanas) y D (18-20 semanas), tratadas con secreciones de glándulas submandibulares e inguinales. Análisis de Kruskal-Wallis con prueba comparaciones múltiples de Dunn. Asteriscos indican diferencias entre grupos (\*P≤0.05, \*\*\*P≤0.001).

Con respecto al diámetro de los folículos antrales grandes (FAG) del ovario izquierdo se encontraron diferencias significativas en los cuatro grupos de diferentes edades tratados con respecto a su grupo control correspondiente (P≤0.05, P≤0.01, P≤0.001). (Figura 2).

En el ovario derecho, hubo diferencias significativas en los grupos de 9 a 11, 12 a 14 y 15 a 17 semanas de edad, siendo mayor en los tres grupos el diámetro folicular de los animales tratados con secreciones con respecto a su grupo control respectivo (P≤0.001). Contrariamente, en el grupo de 18 a 20 semanas de edad no hubo diferencia significativa entre los grupos de animales tratados vs el control (Figura 2).

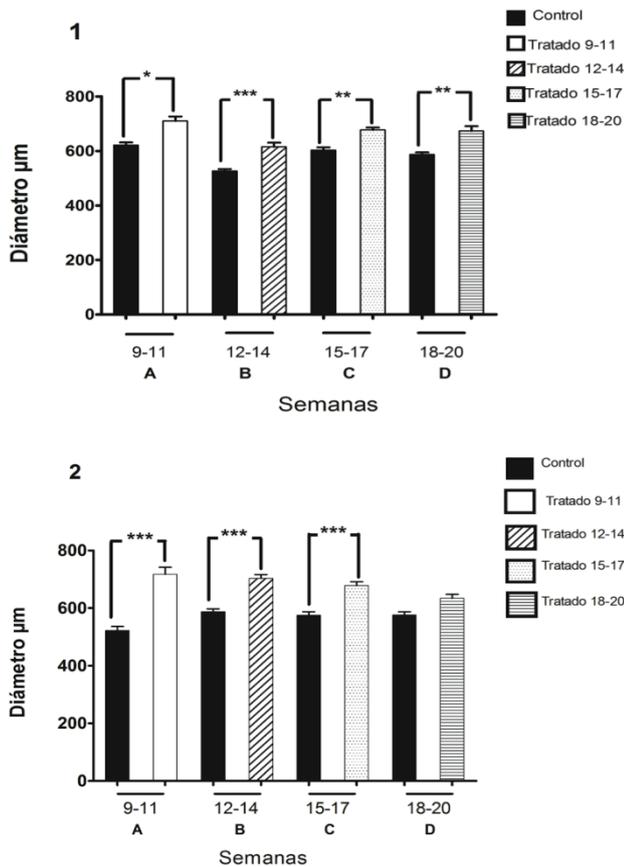


Figura 2. Diámetro ( $\bar{x} \pm$  Error Estándar) de folículos antrales grandes (FAG) de ovario izquierdo (1) y de ovario derecho (2) de conejas de diferentes edades. A (9-11 semanas), B (12-14 semanas), C (15-17 semanas) y D (18-20 semanas), tratadas con secreciones de glándulas submandibulares e inguinales. Análisis de Kruskal-Wallis con prueba comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencias entre grupos (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ).

#### 4. Discusión

Los resultados obtenidos indican que los ovarios derecho e izquierdo respondieron de distinta manera al esquema de estimulación olfatoria proporcionado y que la edad de exposición de las hembras a este estímulo es un factor importante.

Es evidente que, en ambos ovarios de las hembras de todas las edades estimuladas con secreciones, los folículos antrales presentaron mayor diámetro que el grupo control, lo que sugiere que el estímulo olfatorio promovió un mayor desarrollo folicular debido al efecto de las secreciones odoríferas sobre el eje órgano vomeronasal-hipotálamo-hipófisis ovario.

En otros mamíferos de granja se ha demostrado la ventaja que tiene el uso de la bioestimulación sexual en

el manejo reproductivo de la hembra por medio del empleo de machos enteros [14].

Es importante destacar que en el ovario izquierdo de una coneja estimulada con secreciones del grupo de 18 a 20 semanas de edad se encontró un cuerpo hemorrágico. Este hallazgo inesperado nos llama mucho la atención debido a que la coneja ovula como consecuencia del estímulo coital, sin embargo, las hembras utilizadas en nuestro estudio en ningún momento estuvieron en contacto con algún macho. Este hallazgo sorprendente nos sugiere que es posible que el solo estímulo olfatorio sea capaz de inducir la ovulación en esta especie, sin embargo, es necesario corroborar esta hipótesis en futuros estudios. Al respecto, Ola y Oyegbade [15], evaluaron las implicaciones fisiológicas de los estímulos visuales, auditivos y olfativos del llamado "efecto macho" en conejas múltiparas y nulíparas y plantearon que estos estímulos por sí mismos podrían ser suficientes para inducir la ovulación sin que haya contacto físico con el macho o estímulo coital.

El conjunto de resultados obtenidos en el presente estudio indican que el esquema de bioestimulación sexual olfatoria consistente en el uso de secreciones de glándulas cutáneas de conejos macho promovió el desarrollo folicular en ambos ovarios, evento que se observó principalmente en los folículos antrales grandes y que la edad de las hembras estimuladas es un factor clave en el efecto observado. Sin embargo, en próximos estudios será importante determinar la relación de las oleadas de crecimiento folicular ovárico en el período cercano a la pubertad con la concentración de las gonadotropinas FSH/LH en conejas estimuladas olfatoriamente con secreciones de glándulas cutáneas de machos adultos.

#### 5. Conclusiones

El presente estudio aporta evidencias sobre la ventaja que tiene el aprovechamiento de esquemas de estimulación olfatoria en conejas a partir del uso de secreciones de glándulas cutáneas de conejos macho para inducir el desarrollo folicular ovárico en el período peripuberal y en la edad adulta.

#### Agradecimientos

A Francisco López López<sup>†</sup>, Técnico en histología, por su colaboración en el procesamiento histológico.

#### Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no presentar conflictos de interés.

## Referencias

- [1] Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2022). *Histología básica: texto y atlas* (13ª ed.). Médica Panamericana.
- [2] Valdés-Rodríguez R, Torres-Álvarez B, González-Muro J, *et al.* La piel y el sistema endocrinológico. *Gac Med Mex.* 2012;148(2):162-168.
- [3] González-Mariscal G. (2015). ¿Se reproducen como conejos! *Ciencia* (octubre-diciembre): 38-45.
- [4] Camacho-Arroyo I, Cerbón MA, Gamboa-Domínguez A, González-Agüero G. & González-Mariscal G. (1999). Immunocytochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the rabbit submandibular gland. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Molecular & Integrative Physiol.* 123 (2): 179-186. doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00048-3
- [5] König H E. & Liebich H. 2005. Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color. 2ª ed. Buenos Aires. Médica Panamericana. ISBN 847903-748-2.
- [6] Segovia S, García-Falgueras A, Carrillo B, Collado P, Pinos H, Pérez-Laso C, Vinader-Caerols C, Beyer C. & Guillamon A. (2006). Sexual dimorphism in the vomeronasal system of the rabbit. *Brain Res.* 2006; 1102:52-62. doi: 10.1016/j.brainres.2006.05.017
- [7] Harder JD. & Jackson LM. (2003). Male pheromone stimulates ovarian follicular development and body growth in juvenile female opossums (*Monodelphis domestica*). *Reprod Biol Endocrinol.* 1, 21. doi.org/10.1186/1477-7827-1-21
- [8] Aragón HJ, Suárez SJ. & Pérez-Martínez M. (2010). Características morfométricas de los órganos genitales de conejas Nueva Zelanda con distintos pesos corporales en el periodo de transición peripuberal. *Veterinaria. México.* 41(3): 211-218. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-50922010000300005&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922010000300005&lng=es).
- [9] Subcomité institucional para el cuidado y uso de animales experimentales [SICUAE-FMVZ-UNAM]. (2015). MC-2015-1-02. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.
- [10] Hayes R.A, Richardson BJ, Claus SC. *et al.*(2002). Semiochemicals and Social Signaling in the Wild European Rabbit in Australia: II. Variations in Chemical Composition of Chin Gland Secretion Across Sampling Sites. *J Chem Ecol.* 28: 2613–2625. doi.org/10.1023/A:1021452623055
- [11]. Norma Oficial Mexicana. (diciembre 1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [NOM-062-ZOO-1999].
- [12] Hutt KJ, McLaughlin EA. & Holland MK. (2006). Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell Tissue Res.* 326(3):809-22. doi: 10.1007/s00441-006-0223-3.
- [13] Ducoing Watty, A. M. (2016). *Estadística para veterinarios y zootecnistas*. Benito Juárez, Ciudad de Mexico: Newton Edición y Tecnología Educativa.
- [14] Neto AM, Salles MG, Araújo ÉP, Rodrigues IC, Rocha, DR. & Araújo AD. (2016). Male effect: sustainability and effectiveness in inducing estrus in goats/efecto macho: sostenibilidad y eficiencia en la inducción del celo en cabras. *Journal of Veterinary Andrology.*1(1):13-23.
- [15] Ola I. & Oyegbade M. (2012). Buck effect on rabbit oestrous: Vulva colour, vaginal lumen cells and ovarian follicle populations. *World Rabbit Sci.* 20(2):71–79. doi: <https://doi.org/10.4995/wrs.2012.1081>