

Efecto de la administración del flavonoide quercetina en la tasa de ovulación, consumo de alimento y composición corporal en conejas jóvenes y adultas

Effect of administration of the flavonoid quercetin on ovulation rate, feed intake, and body composition in young and adult rabbits does

Jordán-Rodríguez D^{1*}, Vicente-Carrillo A², Cáceres-Martín E², Gómez-León A¹, Rebollar P³, Lorenzo PL¹, García-García RM¹, Arias-Álvarez M²

¹Dept. Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, España.

²Dept. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, España.

³Dept. Producción Agraria, E.T.S.I. Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, 28040, Madrid España.

*djordan@ucm.es

Resumen:

La utilización de antioxidantes como la quercetina (QUR) es de gran interés para mejorar la función reproductiva y la vida útil de las conejas. Para valorar los efectos de este flavonoide sobre dichos parámetros, se realizó un estudio con conejas jóvenes (grupo J) y adultas (grupo A) a las que se administró QUR (300 mg/kg) (JQ y AQ) por vía oral durante 8 semanas y se compararon con conejas sin QUR (JC y AC). Se midió el peso corporal, el consumo de alimento, la composición corporal (% grasa, agua, cenizas, proteína y energía [kJ/100g]) y los parámetros reproductivos (peso medio del ovario, número de cuerpos lúteos [CL], tasa de ovulación, tasa de recuperación y niveles séricos de progesterona [P4]). Los resultados mostraron que la administración de QUR no influye en el crecimiento y mantenimiento del peso de las conejas jóvenes y adultas. La composición corporal se vio afectada por la edad (joven o adulta), con un porcentaje de proteína y agua mayor en las adultas y una tendencia a un mayor contenido graso en las JQ. El peso del ovario fue mayor en las conejas adultas. La tasa de ovulación fue del 100% en todos los animales y no hubo diferencias en el número de CL. Sin embargo, se observó una concentración de P4 mayor en las conejas adultas que en las JC, mostrando las conejas JQ niveles intermedios. En conclusión, la QUR administrada durante 8 semanas podría estar mejorando las reservas energéticas y la producción de P4 en las conejas jóvenes.

Palabras clave: coneja, antioxidante, composición corporal, ovario, progesterona.

Abstract

The use of antioxidants such as quercetin (QUR) has a great interest in improving reproductive function and lifespan in rabbits does. To assess the effects of this flavonoid on these parameters, a study was conducted with young (group J) and adult (group A) does to which QUR (300 mg/kg) (JQ and AQ) was administered orally for 8 weeks and compared with does not treated with QUR (JC and AC). Body weight, feed intake, body composition (% fat, water, ash, protein and energy [kJ/100g]) and reproductive parameters (mean ovarian weight, number of corpora lutea [CL], ovulation rate, recovery rate and serum progesterone levels [P4]) were measured. The results showed that QUR administration did not influence the growth and body weight maintenance of young and adult rabbits does. Body composition was affected by age (young or adult), with a higher protein and water content in adult does and a tendency to increase body fat content in JQ. Ovarian weight was higher in adult rabbit does. Ovulation rate was 100%, and the number of CL was similar for all the groups. Nevertheless, higher P4 levels were observed in adult does than in JC does, showing intermediate levels in JQ does. In conclusion, QUR administered for 8 weeks could be improving energy reserves and P4 production in young does.

Keywords: rabbit, antioxidant, body composition, ovary, progesterone.

Introducción

En los sistemas de producción intensivos, lactación y gestación se solapan, lo que produce un balance energético negativo que afecta a la composición corporal, a las características reproductivas y a la longevidad de las conejas (Lorenzo *et al.*, 2014). La QUR (3,3',4', 5, 7-pentahidroflavona) es un flavonoide que se encuentra en vegetales, frutas, té y vino tinto (Naseer *et al.*, 2017), que tiene efectos positivos sobre la resistencia a enfermedades y la salud en general (Li *et al.*, 2016), incluida la reproducción. En la coneja, la administración de QUR mejora la función reproductiva ya que promueve el desarrollo folicular, disminuye la tasa de apoptosis de las células de la granulosa y mantiene la competencia del oocito en situaciones de estrés térmico (Naseer *et al.*, 2017), aunque es necesario una administración de QUR durante 30-90 días para observar sus efectos. En condiciones fisiológicas, no se ha estudiado si la administración de QUR durante el período de recría (8-16 semanas) podría ser beneficiosa para incrementar su reserva ovárica y mejorar la vida útil de las hembras a largo plazo. El objetivo de este estudio fue analizar si la administración de QUR por vía oral durante 8 semanas y la edad de las conejas (jóvenes y adultas) influye sobre su peso, consumo de alimento y composición corporal y sobre la respuesta ovárica en términos de tasa de ovulación y niveles séricos de P4 al finalizar el periodo experimental.

Material y métodos

Se utilizaron conejas híbridas de Neozelandés blanco x California, que se alojaron en las instalaciones de la granja experimental del Departamento de Producción Agraria, de la ETSIAAB (UPM), en jaulas individuales, con condiciones ambientales controladas (16 h de luz, 18-22° C y humedad relativa del 60-75%). Todas las conejas recibieron un pienso comercial (NANTA, Griñón, Toledo, España), de manera restringida (150 g/día) las adultas y *ad libitum* las jóvenes, con libre acceso al agua. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la UPM y UCM (PROEX 324.6/23).

Las conejas jóvenes de 8 semanas de edad (n=12, grupo J) y las adultas de 12 meses de edad (n=11, grupo A), se dividieron a su vez en dos grupos experimentales: conejas a las que se les administró QUR por vía oral (300 mg/kg), con una jeringa mezclada con zumo de naranja (Grupo Q), y conejas control, a las que se les administró sólo zumo de naranja (Grupo C), durante 8 semanas, estableciéndose cuatro grupos experimentales en total: JC (n=6), JQ (n=6), AC (n=5) y AQ (n=6).

El peso, en conejas adultas y jóvenes, y el consumo de alimento, en conejas jóvenes, se midieron semanalmente. En el grupo JQ la dosis de QUR suministrada se adaptó semanalmente a la ganancia de peso de las conejas. La composición corporal de las conejas se estimó mediante bioimpedancia eléctrica (BIA) al final del periodo experimental, mediante el uso de 4 agujas introducidas a través de la piel que se conectaron a 4 electrodos del dispositivo Quantum II (RJL Systems, Detroit, MI, EEUU) (Sakr *et al.*, 2010). Para el cálculo se aplicaron las ecuaciones de predicción que tienen en cuenta los valores de reactancia y resistencia obtenidos, el peso del animal, el número de parto y el estado fisiológico de la coneja (Pereda *et al.*, 2007).

Al final del periodo de administración de QUR, se indujo la ovulación con 20 µg de gonadorelina (Cystoreline, Ceva Salud Animal, España) por vía I.M. A las 14h se tomaron muestras de sangre de la vena marginal de la oreja, que se mantuvieron a 37°C, 30 min y se centrifugaron (4°C, 700g, 15 min) para obtener el suero que se conservó a -80°C. Los niveles de P4 se cuantificaron por duplicado utilizando un kit enzimoimmunoanálisis (ELISA) (Progesterone ELISA, Demeditec Diagnostics GmbH, Alemania) con un coeficiente de variación intraensayo de <10% e interensayo ≤10%, con un rango de detección entre 0,140-40,0 ng/ml y una sensibilidad de 0,045 ng/ml. La absorbancia fue medida a 450 y 630 nm (Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer System #1706930, Bio-Rad, EEUU).

Después se sacrificaron los animales según el RD 53/2013, se realizó una laparotomía media ventral y se extrajeron tanto los ovarios como los tractos reproductores. A continuación, se pesaron los ovarios y se contaron los CL en la superficie de cada ovario. Para obtener los Complejos Cúmulo-Oocito (COCs) se realizó un lavado oviductal retrógrado con un tampón fosfato salino suplementado con albúmina sérica bovina al 0,1% (PBS-BSA). Se calculó la tasa de recuperación: $[(N^{\circ} \text{ de COCs recuperados} / N^{\circ} \text{ de CL en el ovario}) \times 100]$ y la tasa de ovulación $[(N^{\circ} \text{ conejas que han ovulado} / N^{\circ} \text{ conejas del grupo}) \times 100]$.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa SPSS Statistics (v 29.0.0.1, 2021). La normalidad de los datos se comprobó con el test de Shapiro-Wilk. El peso de los animales se comparó semanalmente

mediante un análisis ANOVA de medidas repetidas. El consumo de pienso de las conejas J se comparó con una t-student. El peso medio de los ovarios, el número de CL, la tasa de ovulación y la de recuperación y los niveles de P4 se analizaron mediante un ANOVA o un test de Kruskal-Wallis con el test *post hoc* correspondiente. Los resultados se muestran con la desviación estándar (DS) y se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados y discusión

El peso de las conejas jóvenes y adultas fue similar en los grupos experimentales con o sin QUR. Las jóvenes de ambos grupos alcanzaron un peso apropiado (aproximadamente un 80% del peso adulto) en el momento en el que habrían recibido la primera inseminación artificial (IA) (Rommers *et al.*, 2002) (**Figura 1A**). Como era de esperar, el peso de estas conejas fue significativamente inferior al de las adultas durante todo el experimento. Estos datos indican que la administración de QUR no parece afectar al crecimiento de las conejas J durante la fase de recría ni tampoco a su consumo de pienso (**Figura 1B**). Las conejas adultas de ambos grupos no mostraron diferencias significativas en el peso ya que su consumo de pienso estuvo restringido y la administración de QUR no modificó este parámetro.

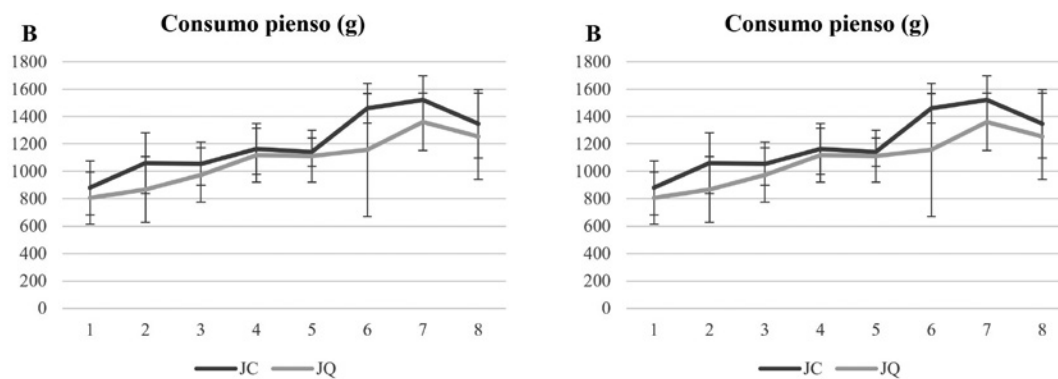


Figura 1. A) Evolución del peso en conejas J y A y B) Consumo semanal de pienso de las conejas J a lo largo del período experimental (8 semanas). Parámetros con letras diferentes muestran diferencias significativas $p < 0,0006$. JC: jóvenes control, JQ: jóvenes con quercetina, AC: adultas control, AQ: adultas con quercetina.

Los resultados de la estimación de la composición corporal (**Tabla 1**) mostraron un porcentaje significativamente mayor de proteína y agua en las conejas adultas que en las jóvenes. El porcentaje de grasa no mostró diferencias significativas excepto en las conejas JQ que tendieron a mostrar un valor superior al de las conejas JC ($p = 0,072$), lo que podría indicar que la QUR puede mejorar las reservas energéticas al inicio de su vida útil. Esto es de gran interés pues podría influir positivamente en la fertilidad a la primera IA y a largo plazo, además de en la vida útil de la hembra, ya que se ha observado que las reservas energéticas de las conejas a la primera IA influyen en los resultados de la segunda IA (Taghouti *et al.*, 2021). El aumento en el porcentaje de agua en las conejas adultas podría indicar que éstas han movilizadas sus reservas energéticas sustituyendo parte de la grasa corporal por agua (Xiccato *et al.*, 2004), manteniendo niveles de energía al final de su vida útil similares a los de las jóvenes que están al inicio de la misma. A su vez, un mayor porcentaje de proteína corporal se ha relacionado con una mayor fertilidad y prolificidad en la coneja, ya que las concentraciones séricas de proteína y leptina están correlacionadas con la calidad de los folículos y oocitos (Taghouti *et al.*, 2021). Nuestros resultados indican que las conejas adultas mostraron un buen porcentaje de proteína al final de su vida útil, y que éste es superior al de las jóvenes, ya que éstas aún no habían alcanzado su peso máximo, y esto podría estar afectando al porcentaje de proteína corporal. Sin embargo, aunque las conejas jóvenes presentaron un menor porcentaje de proteína, este se encontraba dentro del rango fisiológico (18%) el cual permite alcanzar un elevado porcentaje de fertilidad en la primera IA (95,2%) (Taghouti *et al.*, 2021). Las conejas AQ mostraron un mayor porcentaje de cenizas que las JC, mostrando los otros grupos valores intermedios.

Tabla 1. Composición corporal.

	Grupo JC	Grupo JQ	Grupo AC	Grupo AQ
% grasa	4,60±3,16	7,14±0,55*	6,75±0,83	6,59±0,54
% agua	58,04±6,73 ^a	58,03±2,33 ^a	67,79±1,51 ^b	67,58±0,36 ^b
% cenizas	4,05±0,13 ^a	4,08±0,06 ^{a,b}	4,12±0,08 ^{a,b}	4,2±0,06 ^b
% proteína	19,04±0,27 ^a	19,07±0,27 ^a	20,18±0,14 ^b	20,30±0,20 ^b
Energía kJ/100g	651,88±188,79	792,58±30,99	763,78±63,50	772,23±15,25

Parámetros con letras diferentes muestran diferencias significativas entre grupos (humedad y proteína, $p < 0,001$; cenizas $p < 0,041$) y * $p = 0,072$. JC: jóvenes control, JQ: jóvenes con quercetina, AC: adultas control, AQ: adultas con quercetina.

El peso de los ovarios fue significativamente mayor en conejas adultas que en las jóvenes ($p < 0,001$), no encontrando diferencias significativas entre grupos con o sin QUR (**Tabla 2**). Estos resultados son similares a los obtenidos con otros antioxidantes, como el té verde en esta especie (Baláži *et al.*, 2019).

Tabla 2. Parámetros ováricos estudiados y niveles séricos de progesterona.

	Grupo JC	Grupo JQ	Grupo AC	Grupo AQ
Peso medio ovario (g)	0,20±0,03 ^a	0,21±0,67 ^a	0,42±0,10 ^b	0,44±0,06 ^b
Cuerpos lúteos totales	12,83±3,76	14,83±3,92	12,60±3,21	12,33±2,16
Tasa de ovulación(%)	100	100	100	100
Tasa recuperación total (%)	69,02±36,42	82,25±20,86	74,38±24,55	84,62±11,54
Concentración P4	0,45±0,24 ^a	0,69±0,29 ^{ac}	1,23±0,47 ^b	1,10±0,16 ^{bc}

Grupos con letras diferentes muestran diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$), JC: jóvenes control, JQ: jóvenes con quercetina, AC: adultas control, AQ: adultas con quercetina.

En todos los grupos ovuló el 100% de las conejas, sin observarse diferencias significativas ni en el número de CL ni en la tasa de recuperación de COCs. Los niveles séricos de P4 de las conejas adultas fueron mayores que los de las JC ($p < 0,05$), pero las conejas del grupo JQ mostraron niveles inferiores a las de AC pero intermedios respecto a las de los grupos JC y AQ. La P4 es una hormona que se secreta por el CL y es fundamental para el desarrollo embrionario temprano y para mantener la gestación en la coneja. El aumento en la concentración sérica de P4 en las adultas puede ser debido a un mejor desarrollo de los CL en estas conejas. Los mayores niveles de P4 en las conejas JQ podrían estar relacionados con la función fitoestrogénica observada de la QUR, que aumenta la síntesis de ARNm y actividad de la proteína STAR fundamental para la esteroidogénesis (Chen *et al.*, 2007). Además, el mayor porcentaje de grasa de estas conejas podría influir en la concentración sérica de la leptina, aumentándola, lo que está relacionado con mayores niveles de P4 (Menchetti *et al.*, 2020).

En conclusión, la QUR no modifica el peso de las conejas jóvenes, aunque parece favorecer la composición corporal en el momento de su primera IA, ya que mejora el porcentaje de grasa corporal en este momento. Las conejas jóvenes suplementadas con QUR muestran valores de P4 similares a las adultas a las que se les administró QUR. Estos resultados podrían relacionarse con un aumento de la fertilidad en la primera IA y la mejora de la vida útil, aunque son necesarios más estudios a largo plazo para comprobar estos efectos. En las conejas adultas la QUR no parece influir en los parámetros estudiados.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2022-138223OB-I00) y Grupos UCM (920249). Los autores expresan su agradecimiento a la Dra. S. Gimeno-Martos y a B. Velasco Muñoz por su colaboración técnica.

Bibliografía

Baláži A, Sirotkin AV, Földešiová M, Makovický P, Chrastinová L, Makovický P, Chrenek P. 2019. Green tea can suppress rabbit ovarian functions in vitro and in vivo. *Theriogenology* 127:72-79

BM Corp. 2022. IBM SPSS Statistics for Windows (Release 29.0.1.1). Armonk, NY, USA.

- Chen YC, Nagpal ML, Stocco DM, Lin T. 2007. Effects of genistein, resveratrol, and quercetin on steroidogenesis and proliferation of MA-10 mouse Leydig tumor cells. *J Endocrinol* 192(3):527-37
- Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, Liu H, Yin Y. 2016. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients* 8(3):167
- Lorenzo PL, García-García RM, Árias-Álvarez M, Rebollar PG. 2014. Reproductive and nutritional management on ovarian response and embryo quality on rabbit does. *Reprod Domest Anim* 49 Suppl 4:49-55
- Menchetti L, Andoni E, Barbato O, Canali C, Quattrone A, Vigo D, Codini M, Curone G, Brecchia G. 2020. Energy homeostasis in rabbit does during pregnancy and pseudopregnancy. *Anim Reprod Sci* 218:106505
- Naseer Z, Ahmad E, Epikmen ET, Uçan U, Boyacıoğlu M, İpek, Akosy M. 2017. Quercetin supplemented diet improves follicular development, oocyte quality, and reduces ovarian apoptosis in rabbits during summer heat stress. *Theriogenology* 96:136-141
- Pereda N, Rebollar PG, Schwarz BF, Arias-Alvarez M, Revuelta L, Lorenzo PL, Nicodemus N. 2007. Estudio de la composición corporal de conejas reproductoras mediante la técnica de Impedancia Bioeléctrica (BIA). Parte II: Ecuaciones de Predicción. *II Congreso Ibérico de Cunicultura. Vila Real, Portugal, pp 17-20.*
- Rommers JM, Meijerhoft R, Noordhuizen JP, Kemp B. 2002. Relationships between body weight at first mating and subsequent body development, feed intake, and reproductive performance of rabbit does. *J Anim Sci* 80(8):2036-42.
- Sakr O, Garcia-Garcia RM, Arias-Álvarez M, Millan P, Lorenzo PL, Rebollar PG. 2010. Body reserves and ovarian performance in primiparous lactating rabbit does submitted to early weaning as a strategy to decrease energy deficit. *Anim Reprod Sci* 121:294-300.
- Taghouti M, García J, Ibáñez MA, Macchiavelli RE, Nicodemus N. 2021. Relationship between Body Chemical Composition and Reproductive Traits in Rabbit Does. *Animals (Basel)* 11(8):2299
- Xiccato G, Trocino A, Sartori A, Queaque PI. 2004. Effect of parity order and litter weaning age on the performance and body energy balance of rabbit does. *Livest Prod Sci* 85(2-3):239-251.