

EFFECTO DE LA LINEA GENÉTICA DEL MACHO SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOPEPTIDASA DEL PLASMA SEMINAL DE CONEJO

Viudes de Castro, M.P. y Mocé, E.

CITA-IVIA. Polígono la Esperanza, nº 100, 12400. Segorbe (Castellón).

viudes_mar@gva.es

INTRODUCCIÓN

En conejo, al ser una especie de ovulación inducida, la inseminación artificial requiere un control efectivo de la ovulación, por lo que en el momento de la aplicación de la dosis seminal hay que inducir la ovulación. Por ello, en el momento de la aplicación de la dosis seminal se induce la ovulación con un análogo sintético de la GnRH, que habitualmente es administrado por vía intramuscular. El procedimiento de inseminación artificial puede simplificarse sustituyendo la aplicación intramuscular de la GnRH mediante su incorporación en el diluyente (Quintela et al., 2004; Viudes de Castro et al., 2007; Vicente et al., 2008; Ondrusca et al., 2008; Quintela et al., 2009; Vicente et al., 2011), lo que reduce el tiempo de aplicación de la dosis seminal a la vez que evita el riesgo asociado al uso de jeringuillas del personal que aplica la dosis y el estrés animal asociado al pinchazo. No obstante, se ha descrito la presencia de enzimas proteolíticas en el plasma seminal de distintas especies (Morton, 1977; Thurston et al., 1993), por lo que la eficacia de la hormona en el diluyente dependerá tanto de la absorción del compuesto por la mucosa vaginal como de la degradación del análogo por parte de las enzimas presentes en el plasma seminal (Vicente et al., 2011). Por ello, la concentración necesaria del análogo de GnRH cuando se aplica en el diluyente es muy superior a la que se utiliza intramuscularmente.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el posible efecto de la línea genética del macho de conejo sobre la actividad alanina aminopeptidasa del plasma seminal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron machos pertenecientes a dos líneas genéticas distintas, 12 machos de la línea A, seleccionada por tamaño de camada al destete, y 12 machos de la línea R, seleccionada por velocidad de crecimiento en el periodo de engorde (Estany et al., 1989; 1992). Los machos fueron alojados en la granja experimental del Centro de Investigación y Tecnología Animal de Segorbe (CITA-IVIA, Castellón, España). El semen fue recuperado mediante vagina artificial. Los eyaculados fueron evaluados individualmente y aquellos que presentaron una calidad apta para inseminación (70% de motilidad y menos del 15% de formas anormales o acrosomas dañados) se utilizaron para constituir la mezcla heteroespérmica de cada una de las líneas genéticas. En total, se usaron 10 mezclas heteroespérmicas de la línea A y 14 de la línea R. El plasma seminal se obtuvo mediante centrifugación a 10.000 g durante 10 min a 20 °C, el sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar en las mismas condiciones para eliminar espermatozoides residuales, y fue finalmente almacenado a -80 °C hasta su posterior análisis.

La actividad de la enzima alanina aminopeptidasa en el plasma seminal se determinó mediante fluorometría de acuerdo con el método de Greenberg (1962), con algunas modificaciones. Este ensayo se basa en la fluorescencia de la β -naftilamida que es generada en la reacción de hidrólisis del sustrato L-Ala- β -naftilamida que es hidrolizada por la enzima. Cada determinación enzimática se llevó a cabo por triplicado, utilizándose placas blancas de 96 pocillos. Las muestras fueron incubadas con el sustrato durante 30 min a 37 °C, tras los cuales se detuvo la reacción con tampón acetato 0,1 M (pH 4,2). La β -naftilamida liberada como consecuencia de la actividad enzimática se cuantificó fluorimétricamente a 460 nm de emisión, con una excitación de 355 nm. Los valores de fluorescencia obtenidos con las muestras experimentales se transformaron en picomoles de β -naftilamida liberada mediante la extrapolación de sus valores en una recta de calibración previamente obtenida. La cuantificación de proteína total de las muestras seminales se llevó a cabo mediante el método del ácido bicinónico (BCA) utilizando BSA como patrón de proteínas (Smith et al., 1985). Las medidas de actividad enzimática se expresaron finalmente como

pmoles de β -naftilamida liberados por miligramo de proteína contenida en la muestra y por minuto de incubación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se muestran en la tabla 1. En ella podemos observar que existe un efecto significativo ($P < 0,001$) de la línea genética del macho sobre la actividad alanina aminopeptidasa del plasma seminal. La línea A mostraba una menor actividad enzimática que la línea R (141,332 vs 180,151 pmoles/mg de proteína/min). Estos resultados demostrarían la existencia de actividad aminopeptidasa en el plasma seminal del conejo que podría afectar a la actividad del análogo sintético de la GnRH cuando es adicionado al diluyente y que además varía en función de la línea genética de los machos. Esto explicaría las diferencias encontradas entre distintos autores utilizando el mismo análogo sintético pero con machos que pertenecían a diferente línea genética. Así, Quintela et al., (2004), con machos Hyplus precisaban añadir al diluyente acetato de buserelina en una concentración de 16 μ g/dosis de inseminación para obtener una fertilidad y prolificidad comparable a la obtenida por aplicación de la hormona intramuscularmente (0,8 μ g), mientras que Viudes-de-Castro et al., (2007) con machos R, utilizando 5 μ g de acetato de buserelina por dosis de inseminación en el diluyente, obtuvieron tasas de fertilidad y tamaños de camada similares al grupo control (aplicación intramuscular de 1 μ g de acetato de buserelina). Además, Vicente et al., (2008), utilizando la misma concentración de análogo sintético, observaron diferencias entre granjas que utilizaban diferentes líneas de machos (R e Hyplus). Por otra parte, Vicente et al., (2011) demostraron la importancia de la concentración de espermatozoides en los resultados de fertilidad obtenidos al utilizar un diluyente suplementado con 5 μ g de acetato de buserelina por dosis de inseminación. Así, la fertilidad era superior cuanto menor era el número de espermatozoides en la dosis de inseminación (6×10^6 vs. 24, 50 y 100×10^6 espermatozoides). Además, estos autores observaron que la inducción de la ovulación mejoraba significativamente cuanto mayor era la dilución del plasma seminal, es decir, que la eficacia del análogo de GnRH para inducir la ovulación estaba determinada por la tasa de dilución del plasma seminal. En este caso, a diluciones del semen 1/20 la eficacia del diluyente suplementado hormona para inducir la ovulación era similar a la del grupo control (inyección intramuscular de la hormona). Las aminopeptidasas presentes en el plasma seminal pueden afectar tanto al metabolismo como a la funcionalidad del espermatozoide. De los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que la cantidad de alanina-aminopeptidasa presente en el plasma seminal del conejo varía en función de la línea del macho que se utilice, lo que podría afectar a la eficacia del análogo hormonal de GnRH cuando éste se añada al diluyente de inseminación. Por ello, sería necesario estudiar si es posible inhibir la actividad aminopeptidasa del plasma seminal sin que se vea afectado el metabolismo y la viabilidad espermática, la fertilidad de la hembra o el tamaño de la camada. Por otra parte, también sería necesario estudiar la resistencia a la degradación enzimática de los distintos análogos sintéticos de la GnRH utilizados en los diluyentes de inseminación artificial en conejo, ya que la actividad enzimática del plasma seminal determinará la concentración óptima del análogo sintético en el diluyente para que los resultados de inseminación sean similares a los que se obtienen aplicando la hormona intramuscularmente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Greenberg, L.J. 1962. Fluorimetric measurements of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10^{-14} mole. *Biochem Biophys Res Commun*;9:430–435.
- Estany, J., Baselga, M., Blasco, A., Camacho, J. 1989. Mixed model methodology for estimation of genetic response to selection in litter size in rabbits. *Livest Prod Sci*;21:67–75.
- Estany, J., Camacho, J., Baselga, M., Blasco, A. 1992. Selection response of growth rate in rabbits for meat production. *Genet Sel Evol*;24:527–37.
- Quintela, L., Peña, A., Vega, M., Gullón, J., Prieto, C., Barrio, M., Becerra, J., Maseda, F. Herradón, P. 2004. Ovulation induction in rabbit does submitted to artificial insemination by adding buserelin to the seminal dose. *Reprod*

Nutr Develop;44:79–88.●Viudes de Castro M.P., Lavara, R., Marco-Jiménez, F., Cortell, C., Vicente, J.S. 2007. Ovulation induced by mucosa vaginal absorption of buserelin and triptorelin in rabbit. *Theriogenology*;68:1031–36.●Vicente, J.S., Lavara, R., Marco-Jiménez, F., Viudes de Castro, M.P. 2008. Rabbit reproductive performance after insemination with buserelin acetate extender. *Livestock Sci* ;115:153–7.● Ondruška, 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. 9th WRC.● Quintela, L.A., Peña, A.I., Vega, M.D., Gullón, J., Prieto, C., Barrio, M., Becerra, J.J., Herradón, P.G.. 2009. Reproductive performance of rabbit does artificially inseminated via intravaginal administration of [des-Gly 10, D-Ala6]-LHRH Ethylamide as ovulation inductor. *Reprod Dom Anim*;44:829 –33.●Vicente, J.S., Lavara, R., Marco-Jiménez, F., Viudes de Castro. M.P. 2008. Rabbit reproductive performance after insemination with buserelin acetate extender. *Livestock Sci*;115:153–7. ● Vicente, J.S., Lavara, R., Marco-Jiménez, F., Viudes de Castro, M.P. 2011. Detrimental effect on availability of buserelin acetate administered in seminal doses in rabbits. *Theriogenology* 76: 1120–25. ●Morton, D.B. 1977. The occurrence and function of proteolytic enzymes in the reproductive tract of mammals. In: Barret AJ (ed.), *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. Amsterdam: Elsevier North Holland Biomedical Pres. pp:445-500. ●Thurston, R.J., Korn, N., Froman, D.P., Bodine, B.D. 1993. Proteolytic enzymes in seminal plasma of domestic turkey (*Meleagris gallopavo*). *Biol Reprod* 48, 393-402.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto RTA2010-00117-00-00 del INIA y los fondos europeos FEDER y mediante fondos del Subprograma Ramón y Cajal del MICINN (E. Mocé; ref. RYC-2010-06162; Madrid).

Tabla 1. Efecto de la línea genética del macho sobre la actividad alanina aminopeptidasa

Línea	N	Actividad (pmoles/mg de proteína/min)
A	10	141,332 ^a
R	14	180,151 ^b

N= número de mezclas heteroespéricas utilizadas

a, b: valores con distinto superíndice en la misma columna difieren significativamente al 99%(P<0,01)

EFFECT OF THE GENETIC LINE ON THE ALANINE AMINOPEPTIDASE ACTIVITY IN RABBIT SEMINAL PLASMA

ABSTRACT: In rabbits, artificial insemination requires an effective control of ovulation. The most frequent method used for ovulation induction in rabbits artificially inseminated is the intramuscular administration of GnRH, but there are clear breeding advantages using the GnRH analogue on seminal dose. In this respect, several authors reported the possibility of ovulation induction after supplementation of semen extender with a GnRH synthetic analogue. Therefore, the concentration of GnRH analogue needed when it is included in the extender is much higher than that used intramuscularly. On the other hand, seminal plasma from several species has an important aminopeptidase activity, and this proteolytic activity could alter the effective concentration of GnRH analogue available to be absorbed via vaginal mucosa. The aim of this study was to evaluate the effect of the genetic line on the alanine aminopeptidase activity in the seminal plasma of male rabbits. Results showed that A line, selected for maternal characteristics, showed a significantly lower aminopeptidase activity than R line, selected for growth rate from weaning to slaughter. This result suggests that the genetic line of the male could determine the concentration of GnRH analogues needed in supplemented extenders to obtain similar reproductive performance than that obtained after intramuscular administration.

Keywords: aminopeptidase, seminal plasma, rabbit