

EFFECTO DE POTENCIADORES DE PERMEABILIDAD SOBRE LA CALIDAD SEMINAL DE CONEJO

Fernández-Serrano, P., Casares-Crespo, L., y Viudes-de-Castro, M.P.
CITA-IVIA. Polígono de la Esperanza, nº 100. 12400. Segorbe (Castellón).
viudes_mar@gva.es

INTRODUCCIÓN

La técnica habitual de inseminación artificial (IA) en conejo conlleva la aplicación intramuscular de un análogo de la GnRH tras la aplicación de la dosis seminal, ya que se trata de una especie de ovulación inducida. De cara a optimizar la técnica de IA en conejo, se puede inducir la ovulación añadiendo el análogo de la GnRH al diluyente de inseminación. De esta forma, además de mejorar las condiciones de trabajo del personal inseminador, se contribuye al bienestar animal puesto que se evita el daño ocasionado por la inyección y se reduce el estrés, acortando el tiempo de manejo del animal (Dal Bosco et al., 2014). Por ello, la utilización de diluyentes que incorporen el análogo en su composición simplifica la técnica de inseminación en esta especie. No obstante, la concentración necesaria de GnRH que debe añadirse al diluyente para inducir la ovulación es muy superior a la que se administra intramuscularmente (Vicente et al., 2008). Esto se debe en parte a la elevada concentración de aminopeptidasas presentes en el plasma seminal de conejo, las cuales degradan el análogo de GnRH antes de su incorporación al riego sanguíneo (Viudes-de-Castro et al., 2014). En una primera aproximación, nuestro grupo de trabajo planteó la utilización de inhibidores de proteasas en los diluyentes de inseminación (Casares-Crespo et al., 2016), lo que permitiría una mayor disponibilidad de GnRH. Sin embargo, se evidenció que la adición de un cóctel de inhibidores de proteasas, si bien no afectaba a la calidad seminal *in vitro* ni a la fertilidad *in vivo*, reducía el tamaño de camada al nacimiento, por lo que sería necesario probar la utilización de inhibidores específicos de aminopeptidasas.

Una segunda estrategia sería la utilización de sustancias que permitan aumentar la absorción de la mucosa vaginal, lo que haría incrementar la biodisponibilidad de la GnRH para desencadenar la ovulación. Existen compuestos que presentan propiedades mucoadhesivas que contribuyen a potenciar la permeabilidad de las membranas mucosas como por ejemplo algunas sales biliares y macromoléculas como el quitosano y el polivinil alcohol (PVA) (Sharma et al., 2006; Kharenko et al., 2009; Gupta et al., 2011). En porcino, se han utilizado derivados del quitosano, observándose una mejora en la penetración de ciertos compuestos peptídicos a través de la mucosa bucal y vaginal (Sandri et al., 2004; Bonferoni et al., 2008). En esta misma especie también se ha probado PVA con diferentes pesos moleculares en la formulación de films, observándose un aumento de la mucoadhesividad bucal independientemente del peso molecular utilizado (Padula et al., 2013). Por otra parte, en perro se ha observado que la utilización del glicocolato sódico aumentaba la absorción de insulina a través de la mucosa bucal (Aungst y Rogers, 1989). Por tanto, la administración de estos compuestos junto con inhibidores enzimáticos podría suponer una mejora en los diluyentes de inseminación suplementados con análogos de la GnRH, aumentando así la cantidad de hormona disponible sin tener que aumentar su concentración en el diluyente. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de diferentes potenciadores de permeabilidad al diluyente de inseminación, sobre los parámetros de calidad seminal de conejo (motilidad, viabilidad y estado de las membranas).

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo entre mayo y septiembre de 2016, realizándose 6 sesiones de trabajo. Se utilizaron machos de aptitud cárnica (línea sintética R), alojados en la granja experimental de Mejora Genética del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universidad Politécnica de Valencia. Los eyaculados se obtuvieron mediante vagina artificial y se llevó a cabo una primera evaluación subjetiva de la calidad seminal. Se realizó una mezcla heterospermica con aquellos que presentaron valores superiores al 70% de motilidad y menos del 15% de formas anormales y acrosomas dañados. De esta mezcla se cogió una alícuota de 20 μ L y se diluyó 1:50 en una solución de glutaraldehído al 0,25% para calcular la concentración de espermatozoides mediante recuento en cámara Thoma a 400 aumentos y con contraste de fases. Se utilizaron seis diluyentes experimentales, utilizando como control el TCG (Viudes de Castro et al., 1999) suplementado con inhibidores

de aminopeptidasas (10 μ M de bestatina y 20 mM de EDTA) y otros cinco diluyentes experimentales que se prepararon añadiendo cada vez un potenciador de permeabilidad diferente al control (2 mM de Glicolato sódico (G2), 5 mM de Glicolato sódico (G5), 0,1% de Quitosano (Q0,1), 0,5% de PVA (PVA0,5) y 1% de PVA (PVA1). Las mezclas seminales se fraccionaron en seis partes, y cada una de ellas fue diluida (1:5; v:v) con uno de los diluyentes experimentales y puesta a incubar a 37°C. Se tomaron muestras a las 3 y 5 horas de incubación y se evaluaron las características seminales. La motilidad fue valorada mediante un sistema computerizado de análisis de imagen (CASA, ISAS versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España), la viabilidad e integridad del acrosoma se evaluaron mediante citometría de flujo en un citómetro Cytomics™ FC 500 (Beckman Coulter, IZASA, Barcelona, España); empleando para ello los fluorocromos SYBR Green, FITC-PNA y yoduro de propidio. Adicionalmente, a las 5 horas, se realizó un análisis de la funcionalidad de las membranas de los espermatozoides mediante un HOST (Hypo-Osmotic Swelling Test), para lo cual se utilizó una solución hipoosmótica (75 mOsm) con fructosa y ácido cítrico, con la que se diluyó 1:20 una alícuota de cada grupo experimental. Tras 30 minutos de incubación a 37°C se fijó con una solución de glutaraldehído al 0,25% y se contaron un mínimo de 200 espermatozoides por muestra bajo microscopio de contraste de fases a 400 aumentos, calculándose el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional.

El efecto del diluyente empleado y el tiempo de incubación sobre la motilidad, viabilidad, integridad del acrosoma y funcionalidad de membranas fue analizado mediante un análisis de varianza, utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS® Centurion Profesional (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA). Los datos se presentan como medias mínimo cuadráticas \pm error estándar de la media.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tiempo de incubación no tuvo un efecto significativo sobre los parámetros de motilidad, viabilidad y funcionalidad de membrana. Por el contrario, se observó un descenso significativo ($P < 0,05$) de la integridad media del acrosoma a las cinco horas (86,3%) respecto al valor medio a las 3 horas (76,8%), siendo similar en todos los grupos experimentales (valores no contemplados en tablas). Esta caída de la integridad del acrosoma con el transcurso del tiempo es un resultado esperable, ya que los productos del metabolismo de los espermatozoides aumentan con el tiempo, iniciándose una cascada de reacciones que provocan daños sobre la membrana. Resultados similares se han observado durante la conservación de semen de conejo a 15°C, donde a medida que avanza el tiempo se observa también un incremento progresivo en el porcentaje de espermatozoides con daños en acrosoma (Roca et al., 2000). En la Tabla 1 se muestran los resultados de motilidad, viabilidad, integridad del acrosoma y funcionalidad de membranas a las 5 horas de incubación con los diluyentes experimentales. No se observaron diferencias significativas entre los distintos diluyentes en ninguno de los parámetros de calidad seminal analizados. En base a los resultados experimentales de este trabajo se puede concluir que ninguno de los potenciadores de permeabilidad utilizados afecta a la calidad seminal de conejo. Por ello, los diluyentes de inseminación artificial de conejo pueden ser suplementados con estos potenciadores de permeabilidad de la mucosa vaginal sin que afecten a la calidad seminal. Con la presencia de estos compuestos en el diluyente cabe esperar un aumento de la biodisponibilidad de GnRH tal que permita reducir la concentración del análogo en el diluyente. Por lo que son necesarios trabajos futuros para estudiar el efecto de la adición de potenciadores de permeabilidad en los diluyentes suplementados con análogos de GnRH sobre los resultados de fertilidad y prolificidad, así como sobre su biodisponibilidad en la hembra.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aungst y Rogers, 1989. *International Journal of Pharmaceutics*. 53(3): 227-235.
- Bonferoni et al., 2008. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 33: 166-176.
- Casares-Crespo et al., 2016. *Theriogenology* 85:928-932.
- Dal Bosco et al., 2014. *Animal Reproduction Science*. 150: 44-49.
- Gupta et al., 2011. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 5: 82-94.
- Kharenko et al., 2009. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 43(4): 200-208.
- Padula et al., 2013. *AAPS PharmSciTech*. 14(4): 1279-1283.
- Roca et al., 2000. *Animal Reproduction Science*. 64(1-2): 103-112.
- Sandri et al., 2004. *European Journal of*

Pharmaceutical Sciences. 21: 351-359. • Sharma et al., 2006. Pharmazie. 61: 495-504. • Vicente et al., 2008. Livestock Science. 115: 153-157. • Viudes-de-Castro et al., 1999. Ann. Zotech. 48: 407-412. • Viudes-de-Castro et al., 2014. Theriogenology 81: 1223-1228.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto RTA2013-00058-00-00 del INIA. L. Casares-Crespo ha sido financiada por una beca de formación del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y el Fondo Social Europeo. P. Fernández-Serrano ha sido financiada por el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y el Ministerio de Empleo y Seguridad Social (Programa de Garantía Juvenil).

Tabla 1. Efecto de los distintos potenciadores adicionados al diluyente sobre la motilidad, viabilidad, integridad del acrosoma y funcionalidad de las membranas (HOST) tras 5 horas de incubación a 37°C.

Potenciador	Motilidad (%)	Viabilidad (%)	Integridad Acrosoma (%)	HOST (%)
G2	79,2 ± 3,4	75,9 ± 2,3	78,6 ± 8,8	83,6 ± 3,6
G5	74,0 ± 3,4	75,9 ± 2,3	80,1 ± 8,8	86,8 ± 3,6
Q0,1	77,7 ± 3,4	74,1 ± 2,3	77,5 ± 8,8	85,0 ± 3,6
PVA0,5	81,0 ± 3,4	74,8 ± 2,3	75,3 ± 8,8	85,8 ± 3,6
PVA1	79,8 ± 3,4	73,6 ± 2,3	73,8 ± 8,8	81,2 ± 3,6
CONTROL	76,2 ± 3,4	74,0 ± 2,3	75,4 ± 8,8	82,3 ± 3,6

HOST: Hypo-Osmotic Swelling Test; G2: 2 mM de Glicolato sódico; G5: 5 mM de Glicolato sódico; Q0,1: 0,1% de Quitosano; PVA0,5: 0,5% de PVA; PVA1: 1% de PVA; CONTROL: Tris-ácido cítrico-glucosa.

PERMEATION ENHANCERS EFFECT ON SEMINAL QUALITY IN RABBIT

ABSTRACT: Several authors have studied the incorporation of the GnRH analogue in the composition of artificial insemination extenders in rabbits. However, aminopeptidases present in seminal plasma and the vaginal mucosa cause degradation and a reduction of the analogue's bioavailability. Permeation enhancers such as sodium glycolate, chitosan or polyvinyl alcohol may increase the absorption of the vaginal mucosa allowing a greater bioavailability of the analogue per female. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of different permeation enhancers on rabbit seminal quality parameters (motility, acrosome status, viability and membrane functionality). Rabbit seminal samples were incubated up to five hours at 37°C with the following permeation enhancers added to the TCG extender: glycolate (2 and 5 mM), 0.1% chitosan and polyvinyl alcohol (0.5 and 1%). Our results showed that the presence of these permeation enhancers had no effect on the sperm quality, so they could be added to the rabbit seminal dose. The next step would be to test them *in vivo* evaluating if they have some effects on fertility and prolificity.

Keywords: permeation enhancers, seminal quality, rabbit.