

EFFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO RECOMBINANTE DE CONEJO (rr β NGF) EN LA DOSIS SEMINAL SOBRE LA RESPUESTA HIPOFISARIA Y REPRODUCTIVA EN CONEJAS NULÍPARAS

Sánchez-Almánzar, V.¹ Sánchez-Rodríguez, A.², Velasco, B.¹, Arias-Álvarez, M.³, Millán, P.², Cediel R.⁴, Lorenzo P.L., García-García, R.M.², Rebollar, P.G.¹

¹Dpto. Producción Agraria, E.T.S.I. Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, ²Dpto. Fisiología, Facultad de Veterinaria, UCM.³Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, UCM, ⁴Dpto. de Medicina Animal, Facultad de Veterinaria, UCM
pilar.grebollar@upm.es

INTRODUCCIÓN

El conejo es una especie de ovulación inducida, en la que los estímulos sensoriales y neuroendocrinos parecen actuar en conjunto para inducir una oleada preovulatoria de LH (Barbe et al., 1973). En el caso de conejas inseminadas artificialmente (IA), la ovulación se suele inducir con una inyección intramuscular de análogos de GnRH (Rebollar et al., 1997). La tendencia, en la actualidad, es reducir todo lo posible la manipulación de la hembra y el gasto de consumibles (agujas y jeringuillas) en el momento de la IA. Una alternativa para esto podría ser la utilización de la neurotrofina β -NGF, que actúa como factor inductor de ovulación en camélidos (Ratto et al., 2013), incluida en la dosis seminal. Dado que recientemente hemos sintetizado la proteína recombinante de conejo (rr β NGF) (Sánchez-Rodríguez, 2018), el objetivo del presente trabajo ha sido evaluar el efecto de este factor incluido en la dosis seminal, sobre la liberación de LH hipofisaria y la fertilidad en conejas nulíparas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Inicialmente se recolectó semen con vagina artificial de machos propios de la granja experimental de la E.T.S.I. Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. Se hizo un *pool* con los mejores eyaculados y se diluyó a una concentración de 1:5 en un diluyente comercial (Inserbo S.L, Huesca, España). Los animales utilizados fueron 25 conejas nulíparas (Nueva Zelanda x California) con un peso promedio de 4 kg, que se alojaron en jaulas individuales mantenidas bajo un fotoperiodo constante de 16 h luz / 8 h oscuridad, 20–22° C de temperatura y una humedad relativa entre 60–75%.

Las hembras fueron seleccionadas al azar e inseminadas por vía intravaginal con cánulas de vidrio de un solo uso, distribuyéndose en 3 grupos experimentales: 1) grupo SA+NGF (n=9), sedadas vía i.m (0,15 ml de medetomidina + 0,4 ml de ketamina + 0,15 ml de midazolam) y anestesiadas vía epidural (1 ml de lidocaína al 2%) para eliminar el estímulo mecánico, e inseminadas con una concentración de 1 μ g/ml de rr β NGF en la dosis seminal, 2) grupo NGF (n=8), hembras que fueron inseminadas con la misma concentración de rr β NGF en la dosis seminal pero sin sedación ni anestesia, y 3) grupo SD (n=8), inseminadas sin rr β NGF en la dosis seminal, y sin sedación ni anestesia.

Se tomaron 5 muestras de sangre de la arteria central de la oreja, a las 0h (momento de la inseminación), 1, 2, 3 y 4h post-inseminación en tubos con EDTA, que se centrifugaron (3.500 r.p.m., 10 minutos), y el plasma obtenido se congeló a -20° C. Las concentraciones de LH plasmáticas se analizaron mediante un ELISA de competición (Rebollar et al., 2012). El día 10 post-IA se diagnosticó la gestación con una palpación abdominal y el día del parto se controló el número de nacidos vivos y muertos, así como el peso de los gazapos. El experimento se realizó cumpliendo la normativa sobre el empleo de animales de experimentación de la Comunidad de Madrid (PROEX 302/15) según el DR53/2013.

Los resultados de fertilidad fueron analizados con una χ^2 (proc CATMOD), la prolificidad y el peso de los gazapos al nacimiento se sometieron a un análisis de varianza (proc GLM) considerando el tratamiento con rr β NGF como efecto principal. Las concentraciones plasmáticas de LH se analizaron en las conejas preñadas con un análisis de medidas repetidas (proc MIXED) considerando el efecto del tratamiento, el tiempo (0, 1, 2, 3 y 4h) y su interacción, (SAS, 2009). Las medias se compararon con un test *t* y se consideraron estadísticamente diferentes cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sólo se observó respuesta hipofisaria en las conejas de los grupos NGF y SD (figura 1), en los cuales las concentraciones plasmáticas de LH fueron similares para las hembras que ovularon de ambos grupos ($P=0,6890$). No obstante, el pico preovulatorio de LH se retrasó, ya que según Rebollar et al. (2012), este pico en conejas se alcanza a los 60 minutos post-IA e inyección de GnRH, mientras que en este experimento, se alcanzó a los 120 minutos de la IA. Estos datos concuerdan con los observados en camélidos por Adams et al. (2016), donde el pico de LH también se retrasó a 180 minutos post-IA, pero se desconoce la causa, ya que el mecanismo de acción del NGF aún no se ha sido completamente determinado.

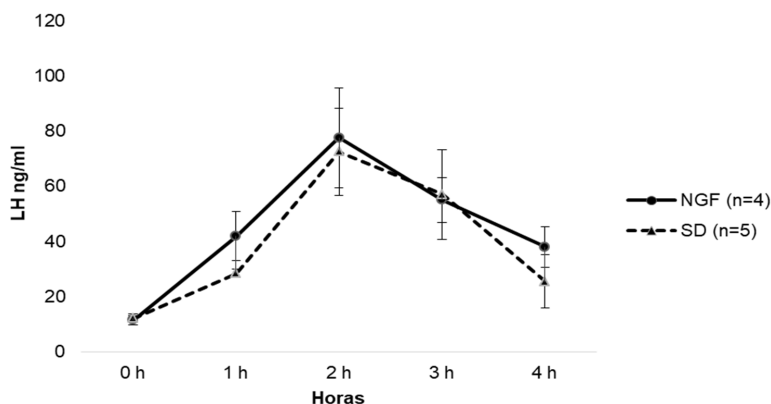


Figura 1. Resultados (media \pm error estándar) de las concentraciones plasmáticas de LH de conejas inseminadas con $rr\beta$ NGF incluido (NGF) o no (SD) en la dosis seminal.

Como podemos observar en la tabla 1, en el grupo SA+NGF, no se detectó gestación alguna tras la palpación, y en los otros dos grupos la fertilidad fue estadísticamente similar ($P>0,05$). Sin embargo, las conejas del grupo NGF parieron 2 gazapos nacidos vivos más que las del grupo SD, ($P=0,0446$), y esto se debe a que una hembra de este último grupo perdió casi la totalidad de la camada en el momento del parto. En cambio, el número de nacidos muertos y el peso medio de los gazapos no resultó diferente estadísticamente ($P>0,05$). Sería necesario aumentar el tamaño de la muestra e incluir hembras de diferentes edades o número de partos para comprobar estos resultados, ya que en este caso se trata de hembras núlparas en las que los problemas en torno al parto son más comunes y, al azar, se han podido concentrar en uno de los grupos.

Tabla 1. Resultados reproductivos (media \pm error estándar) de conejas inseminadas con $1\mu\text{g/ml}$ de $rr\beta$ NGF en la dosis seminal, previa sedación y anestesia (SA+NGF), sin previa sedación ni anestesia (NGF), y con semen diluido sin $rr\beta$ NGF (SD).

| Parámetros | SA+NGF ¹ | NGF | SD | Valor de P |
|-----------------|---------------------|-----------------|----------------|------------|
| n | 9 | 8 | 8 | |
| Fertilidad (%) | - | 50 | 62,5 | 0,6115 |
| Nacidos vivos | - | 11,5 \pm 0,5 | 9,2 \pm 0,71 | 0,0446 |
| Nacidos muertos | - | 0,25 \pm 0,25 | 1,6 \pm 1,1 | 0,3307 |
| Peso gazapo (g) | - | 63,3 \pm 5,35 | 65,2 \pm 8,0 | 0,8567 |

¹En este grupo no quedó ninguna hembra preñada

Los porcentajes de fertilidad obtenidos concuerdan con los publicados por Maranesi et al. (2018), que obtuvieron un 66,7% de conejas ovuladas que atribuyen, en su caso parcialmente,

al NGF incluido en el plasma del semen puro con el que las conejas fueron inseminadas. Asimismo, el porcentaje de ovulación en el presente trabajo es mayor que el obtenido con NGF de origen murino por vía i.m. (17%) (García-García et al., 2018).

En nuestro caso, el hecho de que la respuesta hipofisaria y reproductiva fueran similares en el grupo inseminado con rrβNGF y en el que sólo se inseminó con el semen diluido, no nos permite atribuir un efecto claro de la dosis empleada de rrβNGF en este experimento (1 µg/ml) sobre la ovulación. También es conveniente indicar que las conejas de estos grupos, que no se sedaron ni anestesiaron, estuvieron sometidas a una manipulación para la extracción de sangre cada hora durante 4h, y además, eran animales jóvenes no habituados a este manejo continuado.

Por otro lado, en el grupo de conejas sedadas y anestesiadas por vía epidural no se observó respuesta, a diferencia de las conejas que solo se anestesiaron vía epidural por Maranesi et al. (2018), las cuales ovularon en un 16,7%. Esto puede ser debido a que el sistema nervioso de las conejas de nuestro estudio se bloqueó completamente debido a la sedación previa y se inhibió el posible efecto del rrβNGF por vía nerviosa, lo que indicaría también que el factor no estaría llevando a cabo un efecto por vía local.

En conclusión, es necesario realizar más experimentos, ya que no se puede distinguir el efecto del rrβNGF aplicado en la dosis seminal sobre la respuesta hipofisaria, del estrés causado a los animales en la toma de muestras, en las que se prevé realizar un análisis de cortisol y corticosterona.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams G.P., et al., 2016. *Reprod Domest. Anim. Suppl* 2: 4-17
- Barbe D.L., et al., 1973. *Endocrinology*. 92:1318-1321.
- García-García R.M., et al., 2018. *Italian Journal of Animal Science*, 17:2, 442-453.
- Maranesi M., et al., 2018. *Biol Reprod* 98,634-643
- Ratto et al., 2012. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA* 109: 15042-15047
- Rebollar P.G., et al. 1997. *Rev Esp Fisiol*. 53:205–210.
- Rebollar P.G. et al. 2012. *Theriogenology*. 292-298.
- Sánchez-Rodríguez A. 2018. Tesis Doctoral. UCM.

Agradecimientos: Proyecto CICYT AGL-2015 65572.

EFFECT OF RABBIT RECOMBINANT NERVE GROWTH FACTOR (RRBNGF) IN THE SEMINAL DOSE ON THE PITUITARY RESPONSE AND FERTILITY IN NULLIPAROUS RABBIT DOES

ABSTRACT: In this study the effect of the recombinant neurological growth factor was evaluated studying the pituitary and reproductive response of inseminated rabbit does. Plasma LH concentration and reproductive parameters (fertility and prolificacy) of the females were analyzed. Twenty-five nulliparous does were divided into 3 groups: 1) SA + NGF group (n=9), sedated, anesthetized (epidural), and inseminated with rrβNGF in the seminal dose, 2) NGF group (n=8), inseminated with rrβNGF included in the seminal dose, and 3) SD group (n=8), were inseminated with only diluted semen. In the group SA + NGF, none of the animals resulted pregnant, unlike the other two groups that resulted in around 50%. There were no statistically significant differences between NGF and SD groups in the LH pre-ovulatory surge, stillbirths and body weight of the live born rabbits. In contrast, there was a difference in the number of live born, having the NGF group the best results. The effect on the pituitary response of the rrβNGF added in the seminal dose can not be distinguished from the possible stress caused to the animals in the sampling. In conclusion, further studies with a more representative sample size should be performed in order to verify these results.

Keywords: *reproduction, ngf, rabbits, ovulation.*