

INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN EN CONEJAS CON FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO RECOMBINANTE DE CONEJO MICROENCAPSULADO

El empleo de técnicas de inseminación artificial (IA) ha permitido el aumento de la productividad en las granjas cunícolas gracias a la sincronización de ciclo de las conejas y a la reducción del número de machos que es necesario mantener en la explotación. No obstante, como las conejas son hembras de ovulación inducida, es necesario la aplicación de tratamientos hormonales durante la IA para mimetizar el estímulo nervioso producido durante la monta.

QUIROGA A.C.¹, GARCÍA-GARCÍA R.M.¹, ARIAS-ÁLVAREZ M.², GIMENO-MARTOS S.^{1,4}, LORENZO P.L.¹, REBOLLAR P.G.³

¹Dpto. Fisiología, Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid

²Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid

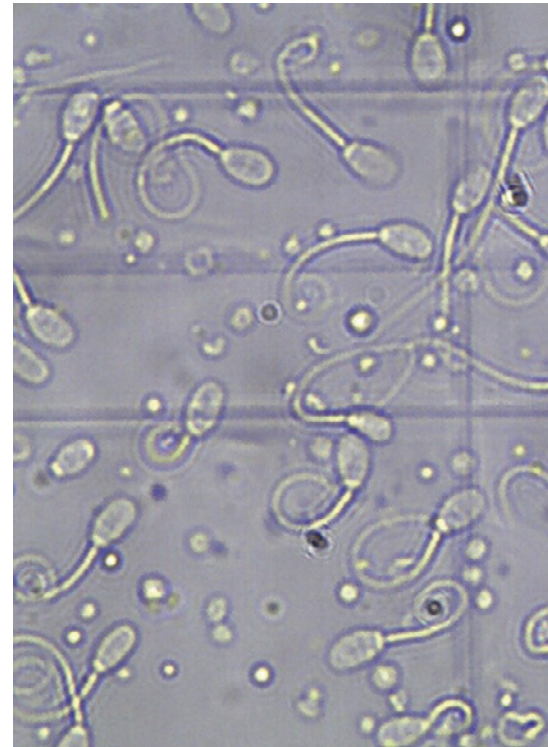
³Dpto. Producción Agraria, E.T.S.I. Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAAB), Madrid

⁴Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

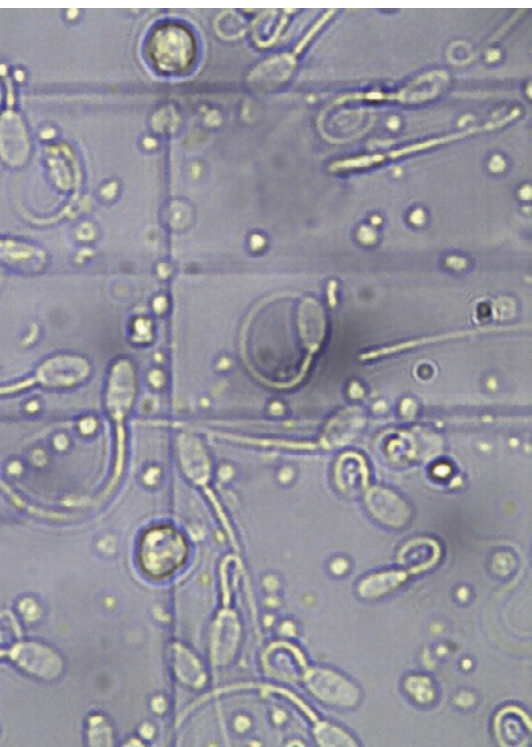


Tras la inducción de la ovulación y la liberación de ovocitos, se forman en los ovarios los cuerpos lúteos, estructuras temporales con función endocrina que producen progesterona, y que provocan un aumento de su concentración en la sangre. Si los ovocitos se han fecundado, los cuerpos lúteos se mantienen hasta el final de la gestación, mientras que, si no hay fecundación, los cuerpos

lúteos empezarán a desaparecer el día 12 post IA. Hasta entonces los niveles de progesterona en sangre serán elevados y las hembras se encontrarán pseudogestantes (Zerani *et al.*, 2021). La aproximación más utilizada para inducir la ovulación en cunicultura es la inyección intramuscular (i.m.) de análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Con el fin de aumentar el bienestar animal y de



reducir la necesidad de manipulación de las conejas, se han buscado métodos para inducir la ovulación que puedan administrarse por vía vaginal durante la IA, aunque para mantener niveles de ovulación similares es necesario usar análogos más potentes, mayores concentraciones o diferentes diluyentes del semen (Quintela *et al.*, 2004; Rebollar *et al.*, 2012; Viudes de Castro *et al.*, 2014). Tanto en los conejos como en otras especies de ovulación inducida se ha descrito la presencia en el plasma seminal de un factor de inducción de la ovulación, que se ha identificado como el factor de crecimiento nervioso beta (β NGF), y que puede jugar un papel muy importante en diferentes procesos fisiológicos reproductivos (García-García *et al.*, 2020). En nuestro laboratorio hemos sintetizado un β NGF recombinante de conejo (rr- β NGF) que, añadido a la dosis seminal a una concentración de 1 μ g/ml, consiguió provocar la ovulación del 60% de las hembras inseminadas (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2019). A pesar de los buenos resultados obtenidos, estos son menores que los observados tras la inyección de GnRH i.m. Una de las posibles razones puede ser la presencia de enzimas en el plasma seminal que estén provocando la degradación del rr- β NGF antes de que pueda ser absorbido por la mucosa vaginal (Viudes de Castro



et al., 2014). Para intentar evitar estos procesos hemos recurrido a la protección del rr-βNGF mediante su recubrimiento en microcápsulas de quitosano. El quitosano es un derivado de la quitina natural, no tóxico y biodegradable, que es usado ampliamente por la industria farmacéutica y alimentaria. Además, algunos compuestos que incluyen quitosano ya han sido utilizados para encapsular análogos de GnRH durante procesos de IA (Casares-Crespo *et al.*, 2018; Hassanein *et al.*, 2021). La microencapsulación podría evitar que el rr-βNGF se degrade rápidamente y permitir que las microcápsulas se adhieran a la mucosa vaginal (Lehr *et al.*, 1992), de modo que la liberación de rr-βNGF sea sostenida en el tiempo y permita que se produzca la ovulación. Por tanto, nuestro objetivo fue comprobar si la administración intravaginal de rr-βNGF microencapsulado con quitosano podía inducir la ovulación en conejas independientemente del estímulo mecánico que supone la introducción de la cánula de IA.

MATERIAL Y MÉTODOS

La microencapsulación del rr-βNGF se realizó mediante oligomerización de las moléculas de rr-βNGF y quitosano, de tal manera que se obtuvo un polvo seco

Tabla 1.

Parámetros productivos de conejas inseminadas y tratadas con 20 µg de gonadorelina (GnRH) vía i.m.; con 0,5 µg de rrβNGF encapsulado con quitosano por vía vaginal 30 minutos antes (NGFch30) o inmediatamente antes (NGFch0) de la inseminación artificial y con una cánula vacía (C).

	TRATAMIENTO				RSM	P>F
	GnRH	NGFch30	NGFch0	C		
n	10	10	10	10		
FERTILIDAD (%)	90 (9/10) ab	100 (10/10) a	60 (6/10) b	-	-	*
CONEJAS OVULADAS ¹ (%)	90 (9/10)	100 (10/10)	66,7 (6/9)	83,3 (5/6)	-	n.s.
PARTOS	9	10	6	-		
Nacidos vivos	12,3±0,93	12,3±0,82	10,8±1,25	-	2,79	n.s.
Nacidos muertos	0,33±0,34	0,50±0,32	1,00±0,41	-	1,01	n.s.

n: nº de conejas. RSM: cuadrado medio del error. *: p<0,05. n.s: no significativo. ¹ Calculadas a partir de las concentraciones de progesterona plasmática el día 7 post-IA (ver el texto). CE: Conductividad eléctrica; MOrG: Materia orgánica; Cot: C orgánico total; Nt: N total.

LA APROXIMACIÓN MÁS UTILIZADA PARA INDUCIR LA OVULACIÓN EN CUNICULTURA ES LA INYECCIÓN INTRAMUSCULAR DE ANÁLOGOS DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINA

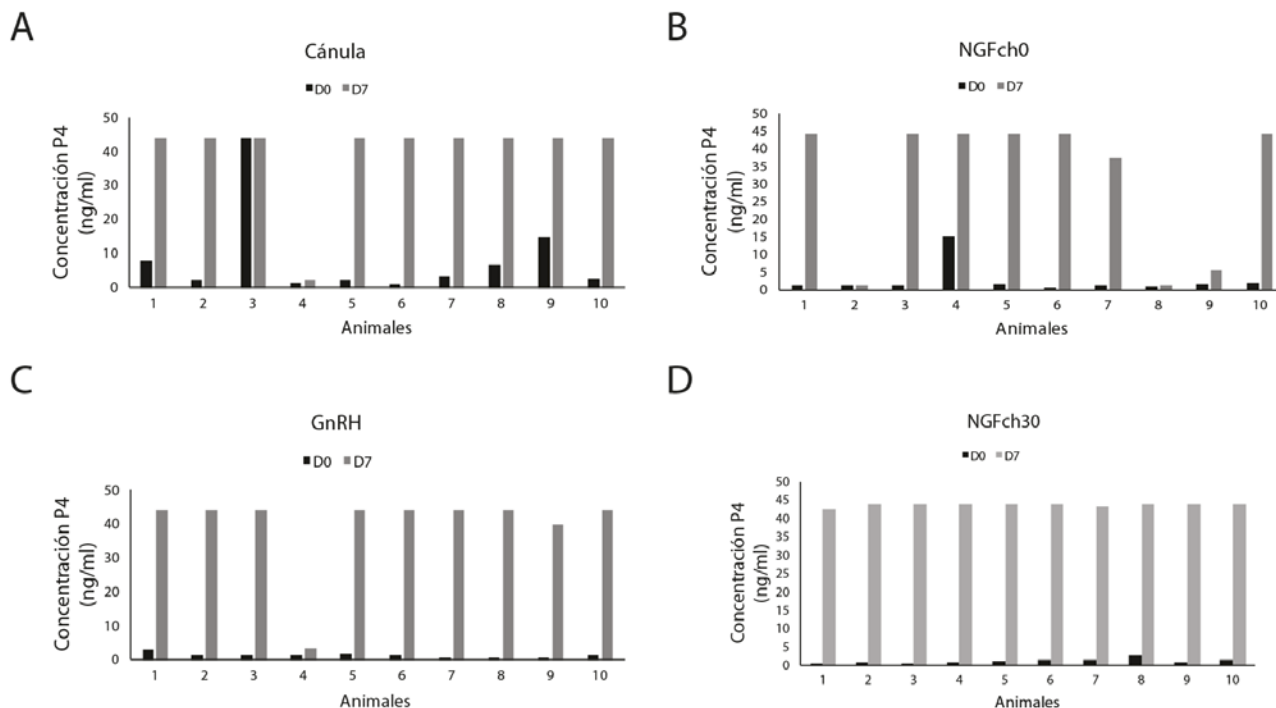
(Aranaz *et al.*, 2009 y 2014) formado por microesferas de un tamaño inferior a 10 µm y con una relación de 0,24-0,44 µg de rr-βNGF por cada milígramo de microesferas. Para su uso en el estudio se resuspendieron en un tampón fosfato (1X PBS) a una concentración final de 1 µg/ml y, mediante técnicas de inmunoensayo (ELISA, Abbexa, abx259154, Cambridge, Reino Unido), se determinó que la mayor parte de la liberación del rr-βNGF se producía a los 30 min de la resuspensión. Para el estudio se utilizaron 40 hembras nulpáras de 18 semanas de edad, alojadas en la granja experimental del Departamento de la ETSIAAB (UPM)

en jaulas individuales y sometidas a un fotoperíodo de 16HL/8HO y una temperatura de 20-22°C (PROEX 302/15). Las hembras se sincronizaron 48 horas antes de empezar el experimento mediante una inyección i.m de 25 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG, Serigán, Lab. Ovejero, León, España). En el día de la IA se recogieron los eyaculados de 3 machos y se mezclaron para obtener una mezcla heteroespérmica, que se diluyó en un diluyente comercial (Inserbo SL, Lérida, España) para obtener una dosis seminal final de 1 ml con una concentración de 28 millones de espermatozoides/ml. Para la IA se utilizaron cánulas de plástico de un solo uso y la coneja se inseminó por un solo operador que la sujetó sobre su jaula. Por otro lado, las conejas se dividieron en 4 grupos experimentales:

- Grupo Cánula: solo se introdujo una cánula vacía en la vagina simulando una IA. Utilizado como control negativo para estimular el reflejo nervioso.
- Grupo NGFch0: se depositó 0,5 µg de rr-βNGF encapsulado en esferas de quitosano (0,5 ml) con una cánula de plástico de un solo uso e inmediatamente después se añadió la dosis de semen con otra cánula.
- Grupo GnRH: se depositó la dosis de semen e inmediatamente después se administró una dosis de 20 µg de gonadorelina, vía i.m (Gestavet GnRH, Lab. Hypra, Gerona, España). Utilizado como control positivo.

Figura 1.

Análisis de la concentración de progesterona (P4) plasmática tras la IA. Concentración de progesterona en plasma sanguíneo en los diferentes grupos experimentales en el día de la IA (D0) y 7 días después (D7). Concentración de progesterona en el plasma sanguíneo en los animales de los grupos experimentales Cánula (A), NGFch0 (B), GnRH (C) y NGFch30 (D) en los días 0 y 7 tras la inducción de la ovulación.



- Grupo NGFch30: se depositó 0,5 µg de rr-βNGF encapsulado en esferas de quitosano (0,5 ml) con una cánula de plástico de un solo uso y, pasados 30 minutos, se inseminaron con la dosis de semen indicada.

Para comprobar si las hembras habían ovulado se analizaron los niveles de progesterona en sangre en muestras obtenidas justo antes de la IA (día 0) y 7 días después. La sangre se recogió de la vena marginal de la oreja en tubos heparinizados, se centrifugó (700 g, 15 minutos) y el plasma se conservó a -20°C. Las concentraciones de progesterona se determinaron utilizando un kit de ELISA (Progesterone ELISA, DE 1561 Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany). Para considerar que las hembras habían ovulado como consecuencia del tratamiento, las concentraciones de progesterona en sangre debían ser menores de 3 ng/ml en el día 0 y superiores a 10 ng/ml en el día 7 (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2020). La fertilidad se calculó como el porcentaje de conejas paridas en relación con el número de conejas inseminadas, y el día

del parto se anotó la prolificidad de cada animal incluyendo los gazapos nacidos vivos y muertos.

Para el análisis estadístico de los datos de los 3 grupos inseminados, se compararon los resultados de fertilidad y de porcentaje de conejas ovuladas con un test Chi² y los de prolificidad con un análisis de varianza, considerando el tratamiento como efecto principal. Las medias se muestran como medias corregidas por mínimos cuadrados (SAS, 2001).

LA FERTILIDAD SE CALCULÓ COMO EL PORCENTAJE DE CONEJAS PARIDAS EN RELACIÓN CON EL NÚMERO DE CONEJAS INSEMINADAS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se muestra en la **Tabla 1**, las hembras del grupo NGFch30 mostraron una fertilidad similar a las hembras del grupo control tratadas con GnRH. Esto puede deberse a que durante los 30 min que transcurren entre la deposición de las microesferas y de la dosis seminal, el quitosano puede adherirse a la mucosa vaginal, liberar su contenido de rr-βNGF y ser absorbido por el epitelio, aumentando así el tiempo durante el cual el NGF se encuentra activo con respecto a los experimentos en los que se utilizó rr-βNGF libre (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2019). No hubo diferencias en el número de gazapos nacidos vivos y muertos con respecto al control positivo. Sin embargo, con la aplicación del rrβ-NGF encapsulado inmediatamente antes de la dosis seminal (NGFch0) no se consiguieron resultados tan satisfactorios ya que, aunque estadísticamente no se observan diferencias significativas con el grupo tratado con GnRH, en valores absolutos sí las hubo, y no se consiguió mejorar el porcentaje previamente obtenido con el rr-βNGF sin encapsular



(Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2020). Quizás, la mezcla en el fondo vaginal del rr- β NGF encapsulado junto con la dosis seminal diluyó en exceso el producto y afectó a las propiedades de adhesión y absorción anteriormente descritas. La prolificidad obtenida fue similar entre los tres grupos experimentales. Para confirmar el número de conejas que habían ovulado se realizó un estudio individual de las hembras de cada grupo experimental. En el grupo Cánula control (**Figura 1.A**), donde solo se introdujo la cánula vacía, se detectaron 9 conejas con altos niveles de progesterona en el día 7. Esto podría indicar que el estímulo mecánico originado con la introducción de la cánula en la vagina fue suficiente

para inducir la ovulación en estas hembras. Sin embargo, 4 conejas de este grupo ya presentaban altos niveles de progesterona en el día 0, indicando que al inicio del experimento podrían estar pseudogestantes. Igualmente, en el grupo de conejas NGFch0 (**Figura 1.B**), 1 hembra también presentó altos niveles de progesterona en el día 0, y por tanto también se podría deducir que también estaba pseudogestante. Esto pudo ser consecuencia de la manipulación a la que fueron sometidas para el tratamiento con eCG 48 horas antes de la IA, pero este efecto no se observó en los grupos GnRH y NGFch30. A la vista de estos resultados, las hembras pseudogestantes se excluyeron del análisis estadístico de los parámetros

productivos y se consideró el número total de conejas como 6 para el grupo Cánula y 9 para el grupo NGFch0. En consecuencia, en el grupo C, ovularon 5 hembras de un total de 6 y en el grupo NGFch0, ovularon 6 hembras de un total de 9, alcanzándose tasas de ovulación similares a las de los demás grupos experimentales (**Tabla 1**). El análisis de los grupos GnRH y NGFch30 permitió confirmar que en el día 7 las conejas que no estaban gestantes presentaban niveles de progesterona <2 ng/ml mientras que en las gestantes las concentraciones eran >40 ng/ml (**Figura 1.C y D**).

Todas las conejas utilizadas en este estudio eran nulíparas y altamente receptivas, ya que fueron sincronizadas con eCG. La mayor vascularización y absorción en la mucosa vaginal (Dal Bosco *et al.*, 2011) ha podido favorecer el excelente resultado de fertilidad en el grupo NGFch30, como una respuesta positiva al estímulo mecánico o nervioso por la introducción de la cánula, provocando en última instancia la obtención de altas tasas de ovulación en todos los grupos.

En conclusión, el NGF microencapsulado con quitosano administrado por vía vaginal 30 minutos después de la IA provoca la ovulación en un porcentaje de conejas similar a las tratadas con GnRH por vía i.m. Sin embargo, en este estudio no se pueden atribuir estos buenos resultados solamente a la administración de rr- β NGF con quitosano, ya que el estímulo mecánico de la cánula fue suficiente para provocar la ovulación en un alto porcentaje de hembras. Por lo tanto, se necesitan más experimentos para poder atribuir efectos específicos sobre la ovulación al NGF, independientemente de los causados por el estímulo mecánico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España (RTI 2018-094404-B-C-21y 22). Gimeno-Martos S. disfruta de un Contrato Margarita Salas financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y la Unión Europea-NextGenerationEU.

BIBLIOGRAFÍA

Queda a disposición del lector interesado en el correo electrónico de la autora: pilar.greballar@upm.es