EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL EN CONEJO

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

INTRODUCCIÓN

El conejo es una especie de ovulación inducida, por lo que en inseminación artificial, además de aplicar la dosis seminal, hay que inducir la ovulación con un análogo sintético de la GnRH. La utilización de diluyentes que incorporen el análogo de la GnRH a su composición, además de simplificar enormemente la técnica de inseminación artificial, es considerada una práctica orientada al bienestar animal (Dal Bosco et al., 2011), ya que evita el dolor que conlleva la administración intramuscular de dicho compuesto. Sin embargo, la eficacia del análogo en el diluyente dependerá tanto de la absorción del compuesto por la mucosa vaginal como de la degradación del mismo por parte de las enzimas presentes en el plasma seminal (Vicente et al., 2011). Por ello, cuando el análogo de GnRH se añade al diluyente de inseminación, la concentración requerida para alcanzar unos niveles de fertilidad similares a los obtenidos con la administración intramuscular es mucho más elevada (en torno a diez veces más). Se ha descrito la presencia de distintas aminopeptidasas en el plasma seminal de mamíferos (Vanha-Perrtula, 1988; Agrawal and Vanha-Perrtula, 1986; Ohkubo et al., 1994; Huang et al., 1997). En el caso del conejo se ha observado que el origen genético afecta a la concentración de aminopeptidasas presentes en el plasma seminal (Viudes de Castro y Mocé, 2013). Además, cuando el análogo de la GnRH es añadido al diluyente de inseminación, su biodisponibilidad depende de la concentración de aminopeptidasas presentes en el plasma seminal (Viudes de Castro et al., 2014). En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inhibición de la actividad aminopeptidasa del plasma seminal de conejo sobre los parámetros de calidad seminal (motilidad e integridad del acrosoma).

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo entre octubre y diciembre de 2014. Se utilizaron machos de aptitud maternal (Neozelandés blanco A) y de aptitud cárnica (línea sintética R) alojados en la granja experimental del Centro de Investigación y Tecnología Animal de Segorbe (CITA-IVIA, Castellón, España). Se obtuvieron muestras seminales usando una vagina artificial. De cada eyaculado se tomó una alícuota que fue diluida 1:5 con el diluyente TCG, descrito por Viudes de Castro et al. (1999) y se hizo una primera evaluación subjetiva de motilidad bajo microscopio a 400 aumentos. Aquellos eyaculados con valores superiores al 70% de motilidad se mezclaron y el resto se descartaron. Se utilizaron un total de 10 mezclas heterospérmicas, 5 por línea. De cada mezcla se cogieron tres alícuotas. Una alícuota de 20 µl se diluyó 1:50 con una solución de glutaraldehído al 0,25% para calcular la concentración y la tasa de anormalidad morfológica, utilizando una cámara Thoma bajo microscopio a 400 aumentos en contraste de fases. Con las otras dos alícuotas se evaluó la motilidad mediante un sistema computerizado de análisis de imagen (CASA, ISAS versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España) y la integridad del acrosoma mediante citometría de flujo en un citómetro Epics XL-MCL (Beckman Coulter, IZASA, Barcelona, España), utilizando los fluorocromos FITC-PNA y yoduro de propidio. En el experimento se utilizaron cinco diluyentes diferentes, TCG (control) y otros cuatro diluyentes experimentales que se prepararon añadiendo al TCG un inhibidor de proteasas diferente cada vez (bestatina 10 µM, EDTA 20 mM, EDTA 30mM y un cóctel comercial de inhibidores de proteasas diluido 1:100 según recomienda el fabricante, Sigma-Aldrich). Las mezclas espermáticas se dividieron en cinco partes iguales y se diluyeron con el diluyente correspondiente (dilución 1:5; v:v). Se dejaron a temperatura ambiente (20-25 ºC) y protegidas de la luz durante dos horas. Tras ese tiempo, se tomó una alícuota para medir de nuevo la motilidad y la integridad del acrosoma y el resto fue utilizado para analizar la actividad aminopeptidasa, para lo cual las muestras fueron centrifugadas a 10110 g durante 10 minutos a 22 ºC, el sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar en las

mismas condiciones para eliminar espermatozoides residuales, y fue finalmente almacenado a -80 ºC hasta su posterior análisis. La actividad aminopeptidasa se midió de acuerdo con lo descrito por Viudes-de-Castro et al. (2014). 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 hidrolizado por la enzima. Brevemente, las muestras fueron incubadas con el sustrato durante 30 min a 37 ºC, 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. Como la actividad enzimática de una muestra está referida a la cantidad de proteína que contiene la misma, se llevó a cabo la cuantificación de proteína total de las muestras seminales mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando BSA como patrón de proteínas (Smith et al., 1985). La actividad enzimática y concentración de proteína se midieron por triplicado. En el cálculo del porcentaje de inhibición de la actividad aminopeptidasa se utilizó como referencia la actividad del grupo control en cada caso.

El efecto del inhibidor y la línea del macho sobre la motilidad, la integridad del acrosoma y la actividad aminopeptidasa fue analizado mediante un análisis de varianza, utilizándose el paquete estadístico Statgraphics®Plus5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA). Los datos se presentan como medias mínimo cuadráticas ± error estándar de la media.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ya se había demostrado previamente la existencia de actividad aminopeptidasa en el plasma seminal del conejo (Viudes de Castro y Mocé, 2013; Viudes de Castro et al., 2014). En el presente trabajo, la línea genética del macho no tuvo efecto significativo sobre ninguna de las variables estudiadas. Los resultados del efecto de los distintos inhibidores de aminopeptidasas sobre la motilidad, integridad del acrosoma e inhibición de la actividad aminopeptidasa se muestran en la Tabla 1. No se observaron diferencias significativas en los resultados de calidad seminal entre los distintos diluyentes utilizados, siendo los valores de motilidad e integridad del acrosoma tras dos horas de incubación, similares en todos los grupos. En lo que se refiere a la actividad aminopeptidasa, ésta era inhibida con todos lo diluyentes experimentales utilizados, observándose diferencias significativas entre ellos. Los diluyentes con EDTA en su composición, a las concentraciones probadas, inhibían significativamente menos la actividad aminopeptidasa que los otros diluyentes, situándose el porcentaje de inhibición por encima del 30%, mientras que con los diluyentes que contenían bestatina y el cóctel de inhibidores se obtuvieron valores de 63 y 65 % de inhibición de la actividad aminopeptidasa, respectivamente. En trabajos anteriores se ha observado que la actividad aminopeptidasa del plasma seminal afectaba a la biodisponibilidad de acetato de buserelina, cuando éste era añadido al diluyente de inseminación artificial (Viudes de Castro et al., 2014). Por ello, la utilización de inhibidores de aminopeptidasas en la composición de los diluyentes de inseminación artificial de conejo permitiría inactivar parte de las aminopeptidasas presentes en el plasma seminal, lo cual, posiblemente disminuiría la degradación que sufre el análogo de la GnRH cuando es utilizado en el diluyente de inseminación. En conclusión, la utilización de inhibidores de la actividad aminopeptidasa en los diluyentes de semen de conejo no afecta a la calidad seminal y reduce considerablemente la actividad alanina aminopeptidasa. Sin embargo, serían necesarios más trabajos para evaluar si existe un efecto de los inhibidores de aminopeptidasas sobre los resultados de fertilidad y prolificidad en la inseminación artificial cuando este tipo de sustancias son añadidas al diluyente, ya que en otras especies como el erizo de mar, la adición de bestatina al esperma afectó negativamente al proceso de fertilización (Yasuhara et al., 1983).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Agrawal and Vanha-Perrtula, 1986. Clin. Chim. Acta 177: 179-95; •Dal Bosco et al., 2014. Anim. Reprod. Sci. 150: 44-49. • Huang et al., 1997. J. Biochem. 122: 779-787. • Ohkubo et al., 1994. J. Biochem. 116: 1182-1186. • Smith et al., 1985. Anal. Biochem. 150: 76-85. • Vanha-Perrtula, T. 1988. Int. J. Androl. 9: 453-52. • Vicente et al., 2011. Theriogenology 76: 1120–25. • Viudes de Castro et al., 1999. Ann. Zootech. 48: 407–412. • Viudes de Castro, M.P. y Mocé, E. 2013. ITEA, TOMO I: 428-430. • Viudes de Castro et al., 2014. Theriogenology 81: 1223–1228. • Yasuhara et al., 1983. J. Biochem. 7(5): 593-598.

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.

Tabla 1*. Efecto de los distintos inhibidores sobre la motilidad, integridad del acrosoma e inhibición de la actividad aminopeptidasa tras 2 horas de incubación.*

Inhibidor	Motilidad (%)	Integridad Acrosoma (%)	Inhibición actividad alanina aminopeptidasa (%)
EDTA 30 mM	85,2±1,6	91,5±1,2	33,17± 2,58[a]
EDTA 20 mM	87,5±1,6	90,8±1,2	37,59± 2,58[a]
Cóctel D 1:100	87,8±1,6	91,5±1,2	63,33± 2,58[b]
Bestatina 10 µM	87,0±1,6	91,6±1,2	65,02± 2,58[b]
Control (TCG)	87,3±1,6	91,3±1,2	---

[a,b]: valores con distinta letra en la misma columna difieren significativamente al 95% (P<0,05).

SEMINAL PLASMA AMINOPEPTIDASE ACTIVITY INHIBITION AND ITS EFFECT ON SEMINAL QUALITY PARAMETERS IN RABBIT

ABSTRACT: GnRH analogues can be absorbed via mucosa less efficiently than via parenteral. This difference may be due to the presence of enzymes in the seminal plasma. These enzymes among which aminopeptidases are included, can condition the hormone bioavailability when the induction of ovulation takes places using extenders with GnRH analogue present in them. In this context, the aim of this study was to evaluate the inhibition of aminopeptidase activity in the rabbit seminal plasma with various inhibitors (bestatin, EDTA and a protease inhibitor cocktail of Sigma-Aldrich®) and study its effect on semen quality. Results showed that the presence of inhibitors did not affect the motility neither the acrosome integrity of the samples. On the other hand, the aminopeptidase activity was inhibited by all extender tested. Extenders with bestatin and Sigma's cocktail inhibited significantly the seminal plasma aminopeptidase activity in a greater extent than EDTA extenders (65 and 63% versus 38 and 33% for bestatin, cocktail, 20mM and 30mM EDTA, respectively). In conclusion, since apparently they do not affect sperm quality and are able to inhibited around the 60% of the seminal plasma aminopeptidase activity, the next step would be to add bestatin or the protease inhibitor cocktail to the seminal extender with the hormone and perform artificial insemination.

Keywords*:* aminopeptidase inhibitors, seminal plasma, rabbit.