

RESPUESTA HIPOFISIARIA EN ALPACAS TRATADAS CON GNRH: ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HORMONA LUTEINIZANTE MEDIANTE UN RADIOINMUNOANÁLISIS HETERÓLOGO

Paolicchi*, F., Bustos Obregón**, E., Alberio*, R. y Urquieta***, B.. 1996.
Rev. Argentina de Producción Animal, 16(4):313-318.
Unidad Integrada Fac. Cs. Agrarias-INTA E.E.A Balcarce. Universidad de Chile
*Unidad Integrada Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata - E.E.A INTA Balcarce, Balcarce, Argentina.
**Facultad de Medicina (N), Universidad de Chile.
***Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Reproducción camélidos](#)

RESUMEN

La alpaca (*Lama pacos*), Camélido Sudamericano doméstico, pertenece al tipo de animales de ovulación inducida. La determinación de la concentración de LH es una herramienta muy útil para estudiar los aspectos reproductivos en esta especie. Con este motivo, desarrollamos un RIA heterólogo utilizando LH estándar de camello y estudiamos la respuesta en diez alpacas fértiles con ovarios en actividad folicular sometidas a estimulación con 4 Ng de análogo de GnRH. Fueron sangradas secuencialmente cada 30 minutos durante 360 minutos para efectuar determinaciones plasmáticas de LH. Posteriormente se sangraron durante 14 días para determinar la concentración plasmática de progesterona (P4) por medio de un RIA de fase sólida, y de estrógenos (E2), por medio de un RIA de fase líquida. Luego de la aplicación de GnRH, LH se incrementó significativamente a los 30 minutos postratamiento en el 80% de los animales y la concentración máxima se registró a los 240 minutos, alcanzando 86,7 ng/ml promedio, para luego disminuir gradualmente hacia los 360 minutos postratamiento. Estas hembras formaron cuerpos lúteos normales con concentración plasmática máxima de P4 ($13,7 \pm 4,6$ nmol/L) en el día 8 postratamiento y la relación E_2/P_4 demostró concordancia con alta actividad folicular en el día 0 ($[E_2]$ $29,1 \pm 2,0$ pg/ml y al finalizar el período de muestreo ($[E_2]$ $25,1 \pm 1,2$ pg/ml). El RIA heterólogo para LH presentó adecuada especificidad inmunológica de acuerdo con las pendientes calculadas por la expresión logit/log de la curva estándar de LH y la curva obtenida con diluciones seriadas. La sensibilidad fue de 0.156 ng y el ensayo fue validado por el análisis de las concentraciones plasmáticas de LH luego del tratamiento con GnRH.

Palabras clave: Camélidos Sudamericanos, alpacas, LH, radioinmunoensayo.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la endocrinología reproductiva en las diferentes especies animales, a través de la determinación de perfiles hormonales ováricos y de la pituitaria, contribuyen a incrementar la fertilidad caracterizando el potencial reproductivo y destacando las anomalías anatómo-fisiológicas que afectan a las hembras. En alpacas (*Lama pacos*), especie doméstica de ovulación inducida, han sido estudiadas las variaciones de los niveles plasmáticos de hormonas derivadas de anomalías reproductivas, así como la respuesta endocrina normal frente a diferentes estímulos inductores de la ovulación (Bravo, Stabenfeldt, Fowler y Lasley, 1992; Bravo, Stabenfeldt, Fowler y Lasley, 1993; Bono, Urquieta, Gabai y Jumale Ahmed, 1994; Sumar, 1994). Hasta el momento, no se ha informado de la obtención y/o purificación de gonadotropinas hipofisarias de Camélidos Sudamericanos (CSA), por lo tanto las investigaciones se efectúan mediante ensayos que utilizan gonadotropinas purificadas de otras especies.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un RIA heterólogo para determinar la concentración plasmática de LH en alpacas adultas sometidas a estimulación con GnRH sintético, utilizando hormona estándar purificada a partir de adenohipófisis de una especie emparentada como el camello dromedario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: fueron utilizadas 10 alpacas raza Huacaya, adultas de fertilidad comprobada, con un peso corporal promedio de 40 kg. Las hembras permanecieron durante el experimento en un corral aisladas y distanciadas del resto del rodeo de alpacas, con buena disponibilidad de forraje verde y agua ad libitum. Todas las hembras fueron sangradas 30 y 7 días antes del comienzo del experimento, para determinar el nivel P₄ plasmática y asegurar que no presentaban cuerpo lúteo activo.

Tratamiento: a cada hembra se le administró una dosis de 4 pg de análogo de GnRH (Buserelin Conceptal, Hoescht) intramuscular. Esta dosis demostró ser efectiva en ensayos previos para desencadenar ovulación en alpacas y vicuñas (Bono y otros, 1994; Urquieta, Fernández, García, Paolicchi y Rojas, 1995).

Obtención de las muestras: se extrajeron muestras de sangre por punción yugular en tubos al vacío con anticoagulante (Venojet, Terumo Med.Co.) y por centrifugación se obtuvo plasma para efectuar las determinaciones hormonales.

Para la determinación de los niveles plasmáticos de LH se tomó la primera muestra inmediatamente antes de la administración de GnRH (0 min) y luego de manera seriada cada 30 min hasta completar 360 min postratamiento (pt). Para la determinación de progesterona (P₄) se tomaron muestras diarias a partir del día del inicio del ensayo (día 0) y durante 14 días posteriores. Se estudió la concentración plasmática de estradiol (E₂) en tres oportunidades diferentes durante el experimento (días 0, 8 y 12).

Análisis hormonales: LH fue determinada según describieron Anouassi y Combarnous (1991) para efectuar ensayos homólogos con hembras camellos. Nosotros introdujimos modificaciones a la técnica y desarrollamos un RIA heterólogo utilizando LH purificada de camello (camLH) como estándar, suero de conejo anti LH de camello (anti-camLH) y LH ovina (oLH) como hormona marcada.

Brevemente, 100 µl de plasma o de camLH (diluida en buffer veronal/albumina 25mM, pH 8,6) se incubaron 48 h a 4°C con 50 µl de anti-camLH (1:6000 dilución inicial). Posteriormente, se agregaron 50 µl de oLH marcada con iodo 125 (10.000 cpm) e incubaron por 24 h adicionales a 4°C. Finalmente se agregaron 50 µl de una Igu de cabra anti-conejo unida a perlas de hierro (Advanced Magnetics Inc.) y todo se incubó a 4°C durante la noche. La separación entre LH unida y libre se efectuó por centrifugación a 2600 g a 4°C durante 20 min. El sobrenadante fue descartado y la radioactividad del sedimento medida en un contador gamma. El coeficiente de variación (CV) interensayo osciló entre 1,0% y 13,4% para los diferentes rangos de la curva estándar. La sensibilidad de este ensayo, según perfiles de precisión, fue de 0,31 ng/ml (9,0% de error). La validación del ensayo se efectuó mediante pruebas de paralelismo entre camLH estándar y distintas diluciones de plasma de alpaca con concentración alta de LH (R = 0,99). Finalmente, la cantidad total de LH liberada fue estimada calculando el área bajo la curva de respuesta LH.

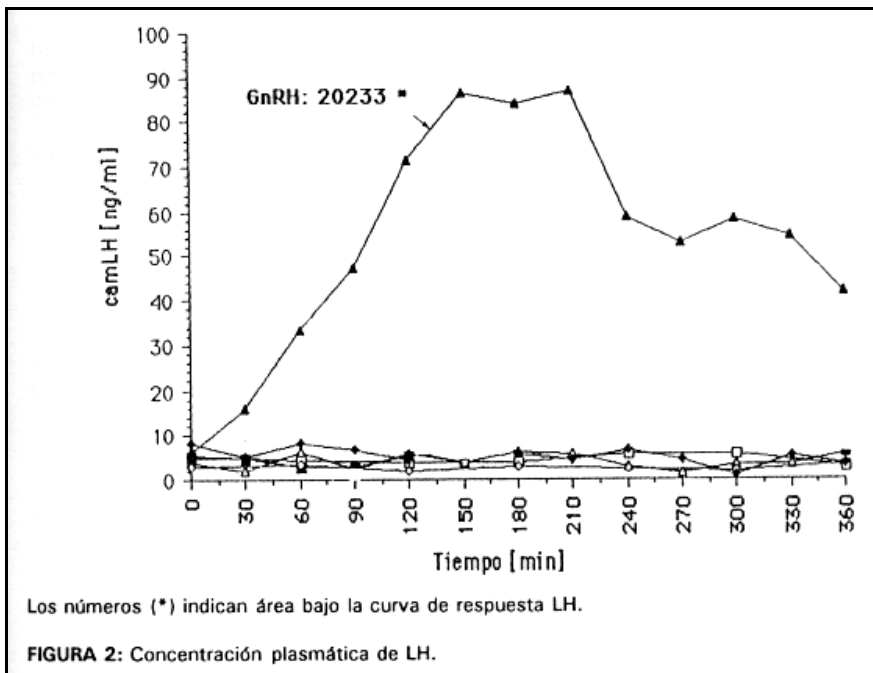
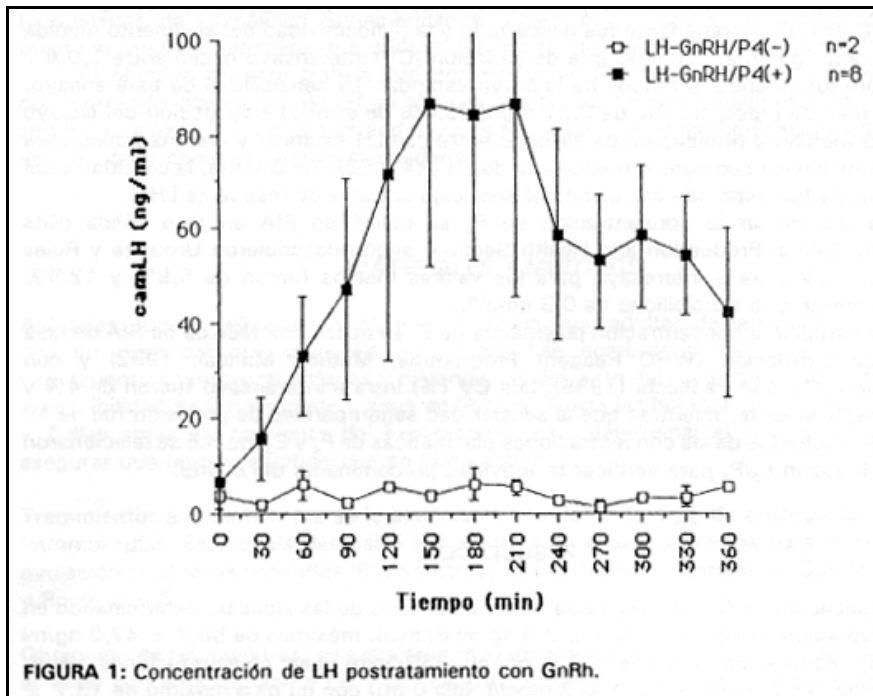
Para determinar la concentración de P₄ se utilizó un RIA en fase sólida (Kits FAO/IAEA, Animal Production and Health Section) según describieron Urquieta y Rojas (1990). Los CV intra e interensayo para los valores medios fueron de 6,9% y 12,5% respectivamente y la sensibilidad de 0,3 nmol/L.

Para estudiar la concentración plasmática de E₂ se utilizó una técnica de RIA de fase líquida con extracción (WHO Reagent Programme, Method Manual, 1992) y con modificaciones según Paolicchi (1995). Los CV (%) intra e interensayo fueron de 4% y 13% respectivamente, mientras que la sensibilidad según perfiles de precisión fue de 10 pg/ml. Los resultados de las concentraciones plasmáticas de P₄ y E₂ (pg/ml) se relacionaron mediante la razón E₂/P₄ para verificar la actividad predominante del ovario.

RESULTADOS

La aplicación de GnRH indujo alza de LH en el 80% de las alpacas, determinando en este ensayo valores iniciales de 6,5 t 3,9 ng/ml (0 min), máximos de 86,7 ± 47,9 ng/ml (210 min), decayendo a 42 ± 17,9 ng/ml (360 min). Las concentraciones de P₄ correspondientes fueron de 0,3 ± 0,3 nmol/L (día 0 pt), con un pico máximo de 13,7 t 4,6 nmol/L (día 8-9 pt) disminuyendo a 0,25 t 0,19 nmol/L (día 12-13 pt), excepto una hembra que presentó valores máximos (7,12 nmol/L) en el día 13 pt. En dos alpacas inyectadas no se detectaron alzas de LH (3,9 t 2,8 ng/ml y 5,6 t 1,6 ng/ml, a los 0 y 210 min pt, respectivamente) y tampoco modificaron significativamente las concentraciones de P₄ (0,22 ± 0,05; 0,03 y 0,01 nmol/L, en los días 0, 8-9 y 12-13 pt, respectivamente), respecto de la concentración registrada antes de la administración de GnRH. Asimismo, la concentración de E₂ en las hembras que respondieron fue de 29,1 ± 2,0 pg/ml (día 0) disminuyó a 13,8 ± 1,0 (día 8) retomando el valor similar al inicial de 25,1 ± 1,2 pg/ml (día 12). Por lo tanto, la razón E₂/P₄ demostró concordancia con los altos niveles de E₂ al inicio (R = 66; día 0) como al finalizar el período de muestreo (R = 25; día 12), mientras que la misma fue inversa durante el predominio de la fase luteal (R = 1; día 8) cuando se registró la más alta concentración de P₄. La cantidad de LH liberada luego de la aplicación de GnRH, estimada como área bajo la curva de respuesta, mostró una gran diferencia entre las alpacas que respondieron (20.233 ng/ml) respecto de aquellos animales que no respondieron (2.187 ng/ml).

En las Figuras 1, 2 y 3 se observan los resultados del estudio de la concentración plasmática y las correspondientes curvas de respuesta hormonal hipofisiaria (LH) y ovárica (P,) luego de la administración de GnRH.



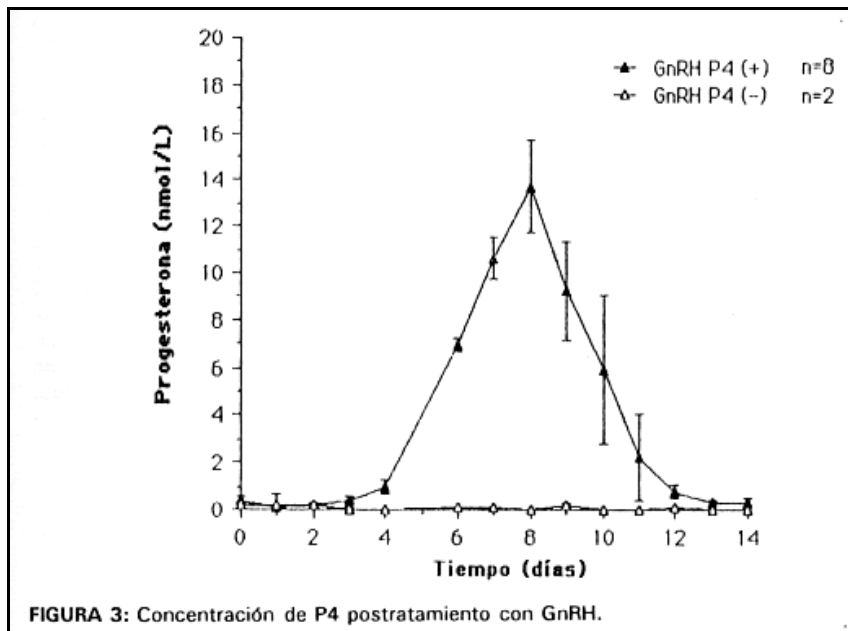


FIGURA 3: Concentración de P4 postratamiento con GnRH.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados son similares a los de trabajos previos efectuados en alpacas y llamas, relacionados a la secreción de LH en respuesta a la cópula o a la inyección de GnRH sintética (Aba, 1995; Bravo y otros, 1992; Bravo y otros, 1993; Bono y otros, 1994). A pesar que las concentraciones plasmáticas de LH medidas en este trabajo correspondientes a las hembras que respondieron, fueron más altas que las obtenidas por otros investigadores, el comportamiento postratamiento determinado por la secreción hormonal (área bajo la curva de secreción de LH) es indicativo de la adecuada respuesta al estímulo. Además, se observa gran similitud entre nuestros resultados y los obtenidos por Anouassi y Combarous (1991) quienes estudiaron la concentración de LH en hembras dromedarias inyectadas con GnRH, mediante un RIA homólogo utilizando idénticas camLH y anti-camLH a las usadas en este trabajo. Las alpacas que no respondieron al tratamiento no superaron los 7,5 ng/ml de LH y tampoco formaron cuerpo lúteo. Las mismas hembras demostraron fracaso reproductivo al no quedar preñadas en el servicio con monta natural posterior a este ensayo, mientras que las alpacas que respondieron al tratamiento con GnRH demostraron ser fértiles y gestar una cría cada una. Los resultados de estos ensayos efectuando las modificaciones descritas, demostraron perfiles de precisión, especificidad y sensibilidad satisfactorios. A pesar de que un mayor número de ensayos deberán realizarse, los resultados obtenidos permiten concluir que el uso de este RIA heterólogo utilizando hormona estándar camello es sumamente útil como herramienta para determinar en forma clínica concentración de LH, no sólo en muestras de alpacas, sino también de otros CSA domésticos y silvestres.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio Recabarren (Universidad de Concepción, Chile) por la donación de oLH. Al Dr. Yves Combarous (INRA, Francia) por la donación de camLH. Este trabajo fue parcialmente financiado por el Departamento de Postgrado y Postítulo, Universidad de Chile, PG-083-94, IAEA Technical Cooperation Projeet CHI/5/03 y Proyecto Camélidos Sudamericanos INIA, Chile.

BIBLIOGRAFÍA

- ABA, M. 1995. Studies on the reproductive endocrinology of llamas and alpacas. Thesis of Master of Veterinary Science, pp 11-77. Swedish University of Agricultura; Sciences, Uppsala.
- ANOUASSI, A. y COMBARNOUS, Y. 1991. Development of radioimmunoassay and enzyme immunoassay for luteinizing hormone in dromedaries (*Camelus dromedarius*). *J.Reprod.Fert.* 93: 409-414.
- BONO, G., URQUIETA, B., GABAI, G. y JUMALE AHMED, M. 1994. Radioimmunoassay of alpaca (*Lama pacos*) plasma luteinizing hormone (LH). XLVIII Convegno, SISVet, Brescia.
- BRAVO, P., STABENFELDT, G., FOWLER, M. y LASLEY, B. 1992. Pituitary response to repeated copulation and/or gonadotropin releasing hormone administration in llamas and alpacas. *Biol.Reprod.* 47: 884-888.
- , STABENFELDT, G., FOWLER, M. y LASLEY, B. 1993. Ovarian and endocrine patterns associated with reproductive abnormalities in llamas and alpacas. *J.A.V.M.A.* 202 (2): 268-272.
- PAOLICCHI, F. 1995. Administración de plasma seminal nativo en alpacas: efecto sobre los niveles plasmáticos de hormona luteinizante y progesterona. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas. 86 pág. Escuela de Posgrado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- SUMAR, J. 1994. Effects of various ovulation induction stimuli in alpacas and llamas. *J.Arid Environm.* 26: 39-45.

- URQUIETA, B. y ROJAS, J. 1990. Studies on the reproductive physiology of the vicuña (*Vicugna vicugna*). Proceeding of the Meeting FAO/IAEA/ARCAL 111 Regional Network for improving Reproduction Management of Meat- and Milk-producing Livestock in Latin America. IAEA. pp 407428.
- FERNANDEZ, M., GARCÍA, A., PAOLICCHI, F. y ROJAS, R. 1995. Efecto del análogo de GnRH (Buserelina) sobre los niveles plasmáticos de estradiol y progesterona, así como sobre la morfología ovárica y citología vaginal en vicuña adulta no gestante. IX Congreso Nacional de Medicina Veterinaria, Chillán, Chile 1995.

Volver a: [Reproducción camélidos](#)