

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PLASMA SEMINAL DE ALPACA: ESTÍMULO PARA LA PRODUCCIÓN DE LH POR CÉLULAS GONADOTROPAS

Paolicchi^{1,2}, F., Urquieta³, B., Del Valle², L. y Bustos O.², E.. 1996.
Rev. Argentina de Producción Animal, Bs. As., 16(4):351-356.

1. Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, CC 276, (7620) Balcarce, Argentina.

2. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

3. Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Reproducción camélidos](#)

RESUMEN

Los Camélidos Sudamericanos son animales de ovulación inducida y requieren un estímulo para iniciar la oleada de LH responsable de la ovulación. Plasma seminal (PS) de alpacas (*Lama pacos*) fértiles fue probado en este experimento para estudiar el efecto del plasma seminal sobre la liberación de LH usando un bioensayo de células pituitarias. Placas de cultivo conteniendo células de pituitaria de rata (2×10^5 células/90-95% de viabilidad) fueron cultivadas agregando: A) PS tratado con carbón dextrano en proporción de 1:1, 1:2 y 1:4 diluido en medio de cultivo (DMEM/HEPES + antibióticos) o B) PS 1:2 + suero de conejo anti-GnRH (potencia inhibitoria de 10^{-5} M), o C) PS 1:2 + anti-GnRH + GnRH sintética (acetato de buserelina) 100 nM, o D) GnRH sintética 100 nM, 50 nM, 10 nM y 1 nM. Se analizó la concentración de LH (ng/ml) secretada (Sec) y de la contenida (Con) endocelular mediante un RIA I^{125} y se determinó el porcentaje de Sec y de Con en cada experimento. Los resultados de LH Sec por las células tratadas con GnRH 50 nM, 10 nM y 1 nM fueron de 39%, 13% y 1,5%, respectivamente ($r^2=98,41\%$; $r=0,9920$). Sin embargo las células tratadas con 100 nM de GnRH secretaron sólo 10% de LH. Con PS 1:1, 1:2 o 1:4 la LH Sec fue de 44,5%, 27% y 18%, respectivamente. La exposición de las células al tratamiento con PS 1:2 + anti-GnRH o de PS 1:2 + anti-GnRH/GnRH produjo un 31 % y un 30% de LH Sec, respectivamente. Estos resultados sugieren que el PS de alpacas podría contener algún factor/es, diferente/s de GnRH, que contribuya/n con los mecanismos de secreción de LH y con la ovulación inducida de la hembra alpaca.

Palabras clave: Camélidos Sudamericanos, alpacas, plasma seminal, cultivo de adenohipófisis, LH.

INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos (CSA) al igual que los camélidos del viejo mundo presentan ovulación inducida, cuya respuesta depende del estímulo al cual sea sometida la hembra. Alpacas (*Lama pacos*) y llamas (*Lama glama*) ovulan en respuesta a la cópula simple o múltiple con un macho fértil y/o vasectomizado y con la administración de GnRH sintética o de hCG (Bravo, Stabenfeldt, Fowler y Lasley, 1992; Sumar, 1993). Si bien los mecanismos que gobiernan la ovulación en camélidos no están suficientemente determinados, es posible que estímulos neuroendócrinos y sensoriales se conjuguen para determinar la respuesta ovulatoria. Algunos experimentos conducidos en camellos (Chen, Yuen y Pan, 1985) y en alpacas (Ríos, Sumar y Alarcón, 1985) depositando semen homólogo intravaginal, produjeron respuestas ovulatorias en un porcentaje importante de las hembras utilizadas, lo cual sugiere la presencia de algún factor presente en el semen de estas especies que contribuye a la respuesta ovulatoria. El objetivo de este experimento piloto, fue estudiar el efecto del plasma seminal de alpacas sobre la respuesta secretoria de LH utilizando un bioensayo de células de adenohipófisis (Scott, Burger y Quigg, 1980), con modificaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

A) Obtención y evaluación del semen.

Se utilizó semen de eyaculados completos provenientes de machos alpaca raza Huacaya adultos de fertilidad probada. Las muestras utilizadas fueron colectadas con vagina artificial diseñada para la especie y utilizando fundas de polietileno adaptadas como describieron Urquieta, Paolicchi y Bustos Obregón (1995). Las muestras de semen fueron evaluadas como normales según: a) parámetros de Organización Mundial de la Salud (WHO, 1989) para espermogramas de rutina, b) por análisis del plasma seminal y de vitalidad espermática, estandarizados con

anterioridad para alpacas (Urquieta, 1996) y c) análisis morfológico ultraestructural por microscopía electrónica de barrido y de transmisión de espermatozoides separados del plasma seminal (Bustos Obregón, Paolicchi y Urquieta, 1995).

B) Tratamiento del semen y del plasma seminal.

El semen obtenido fue centrifugado (2500g x 20 min) y el sobrenadante, considerado: plasma seminal, se almacenó en alícuotas a -20°C. En el momento de su uso, fue tratado con una suspensión de 1,25% de carbón-dextrano en buffer pH 7,4 durante 30 min en agitación a 0°C y luego de centrifugado se recuperó el sobrenadante.

c) Preparación del cultivo celular.

Adenohipofisis de 15 ratas macho adultas Sprague-Dawley fueron extraídas, trozadas y homogeneizadas durante 60 min a 160 oscilaciones/min y a 37°C en 10 ml de medio Cultivo adicionado con enzimas (DMEM, bicarbonato de sodio 2,2 g/L, HEPES 5,958 g/L BSA (V) 1 g/L, amfotericina B 10 ml, colagenasa 1 mg/ml, hialuronidasa 0,5 mg/ml, tripsina 5 µg/ml), para posteriormente agregar 1 mg/ml de ADNasa durante 20 min adicionales. La suspensión celular fue lavada en 10 ml de DMEM libre de enzimas y centrifugada (500 g x 15 min) cuatro veces, la primera con 1 mg/ml de inhibidor de tripsina. El sedimento fue resuspendido con DMEM más 10% de suero fetal bovino y estimada la concentración y viabilidad celular (azul tripán 0,5 % en PBS 0,1 M, pH7,2). Finalmente la suspensión celular (90-95 % de viabilidad) fue colocada en placas de cultivo de 24 pocillos y la concentración ajustada a 200.000 células/pocillo en 0,5 ml de medio de cultivo, en estufa a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de aire. Las células fueron cultivadas durante 48 h para su adherencia a la placa.

d) Bioensayo de células adenohipofisarias.

Las células fueron incubadas con las distintas muestras según el siguiente esquema:

- 1.- GnRH sintética, acetato de buserelina, (Conceptal, Hoescht) 100 nM, 50 nM, 10 nM y 1 nM;
- 2.- Plasma seminal entero (PS 1:1) o plasma seminal diluido con medio de cultivo (PS 1:2 y PS 1:4);
- 3.- Plasma seminal 1:2 + suero de conejo anti-GnRH con potencia inhibitoria de hasta 10⁻⁶ M de GnRH sintética (Bustos Obregón, Van Rysselberghe y Rodríguez, 1992);
- 4.- Plasma seminal 1:2 + anti-GnRH + GnRH 100 nM.

En cada pocillo se colocaron 0,2 ml de muestra más 0,2 ml de medio de cultivo durante 72 h. Posteriormente, las células fueron lavadas en 0,3 ml de medio libre de suero nuevamente expuestas a las mismas muestras por 6 h adicionales, colocando en cada pocillo 0,15 ml de la muestra y 0,15 ml de medio.

Además, pocillos conteniendo células incubadas con medio de cultivo no fueron expuestas a las muestras anteriormente citadas y sirvieron como control no estimulado. Finalizada la incubación, los sobrenadantes se recogieron y congelaron a -20°C, mientras que las células fueron lavadas con 0,3 ml de medio y lisadas con 0,5 ml de PBS suplementado con 0,1 % de Tritón X-100, durante la noche a 4°C.

E) Análisis de LH.

Se analizaron las concentraciones (ng/ml) de LH secretada (Sec) y LH contenida (Con) por las células adenohipofisarias, mediante un radioinmunoanálisis de fase sólida (RIA-1126) (NHPP, Rockville, MD, USA). El antígeno altamente purificado (NIDDK-rLH-I-9) fue iodado con 0,5 mCi de I¹²⁵ por el método del yodógeno, obteniendo una actividad específica de 11.705 cpm/ng de hormona. El primer anticuerpo producido en conejo (NIDDK-anti-rLH-S-11) se utilizó a una dilución final de 1:700.000, mientras que el segundo anticuerpo cabra-anti IgG de conejo (immunobead, Bio-Rad Lab, CA, USA) fue usado en exceso. Los resultados fueron expresados en referencia al estándar (NIDDK-rLH-RP-3). Los coeficientes de variación inter e intraensayo usando suero normal de rata macho fueron de 15,9% y 4,9%, respectivamente. Posteriormente se determinaron los porcentajes correspondientes de Sec y Con en cada uno de los experimentos (por triplicado).

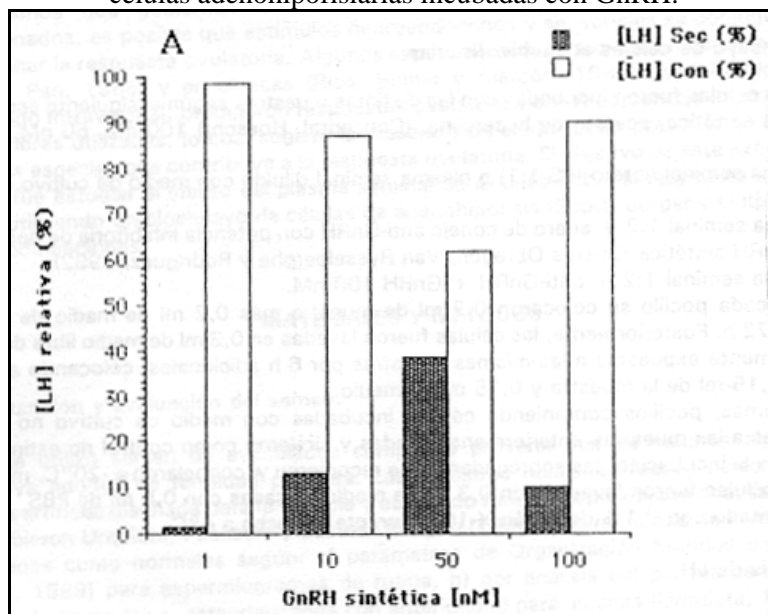
F) Análisis de los resultados.

Las curvas del RIA fueron analizadas usando un modelo logit-log. La comparación entre tratamientos fue realizada con el Test de Mann-Whitney y los efectos dosis dependiente analizados con correlación de Pearson (r) utilizando ANOVA para su validación. Las diferencias estadísticas fueron establecidas con un 5% de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

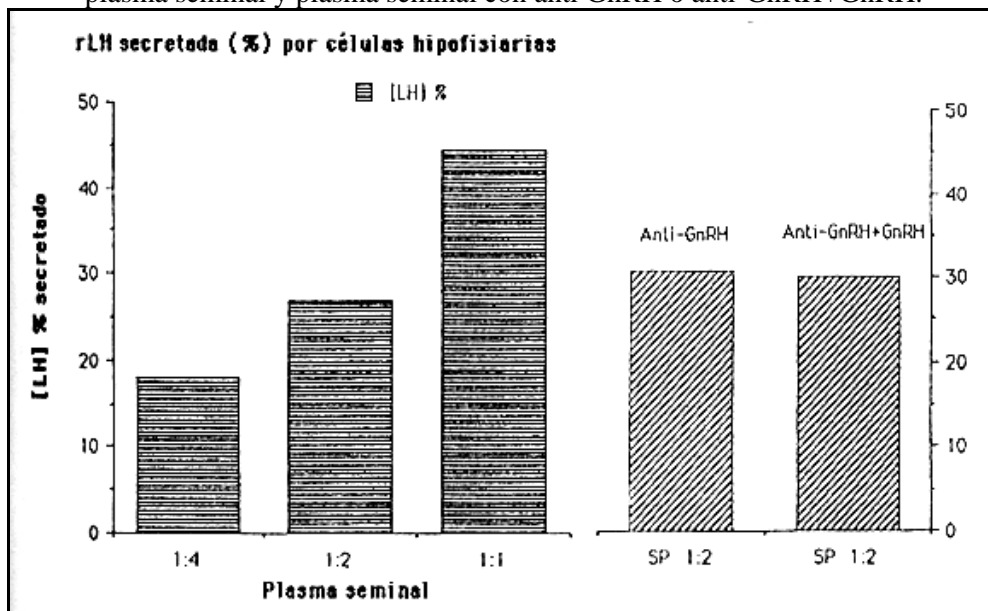
La respuesta celular de LH Sec observada luego del tratamiento con GnRH sintética a las dosis de 50, 10 y 1 nM fue de 39%, 13% y 1,5%, respectivamente (r₂= 98,41 %; r= 0,9920; ANOVA p>0,05). Sin embargo, con dosis de GnRH de 100 nM la LH Sec fue significativamente menor (10%) [Figura A].

Figura A: Porcentaje de LH secretada ([LH]Sec) y contenida ([LHCon]) por células adenohipofisarias incubadas con GnRH.



La exposición de las células al PS determinó una progresiva disminución en la LH Sec, con valores de 44,5% para el PS 1:1, significativamente diferentes ($p < 0,03$) de 27% para PS 1:2 y de 18% para PS 1:4. La exposición de las células al tratamiento PS 1:2 + anti-GnRH y a PS 1:2 + anti-GnRH/GnRH sintética provocó un 31 % y 30% de LH Sec, respectivamente [Figura B]. Estos resultados indican que el PS de alpaca adulto podría contener algún(os) factor(es) capaz de provocar la secreción de LH por células gonadotropas hipofisarias de rata, pero que este efecto no sería mediado por un factor GnRH "like" debido a que la exposición de las células al PS junto con anti-GnRH no modificó la LH Sec.

Figura B: Porcentaje de LH secretado por células adenohipofisarias incubadas con plasma seminal y plasma seminal con anti GnRH o anti-GnRH+GnRH.



Si bien en el PS de camellos, emparentados filogenéticamente con los camélidos sudamericanos, se ha sugerido la presencia de un GnRH "like" (Zhao, Huang y Chen, 1990) capaz de estimular la secreción de LH por células adenohipofisarias en cultivo, con los resultados obtenidos aquí se podría especular que el PS de machos alpaca adultos fértil contribuiría (en un porcentaje aún no determinado) a la secreción de LH y consecuentemente a inducir la ovulación en hembras de la especie. Por otro lado, desconocemos el mecanismo por el cual GnRH en concentración de 100 nM inhibió la secreción de LH, pero es probable que un efecto denominado "down-regulation" de los propios receptores celulares de GnRH y por saturación de ellos, haya condicionado esta menor respuesta en secreción de LH. Asimismo, este efecto también mostró que el anticuerpo anti-GnRH fue

capaz de neutralizar GnRH, ya que la dosis de GnRH 100 nM no disminuyó, como era esperable, la secreción de LH por parte de las células gonadotropas.

Recientemente, Wabersky, Sudhoff, Hahn, Jungblut, Kallweit, Calvete, Ensslin, Hoppen, Wintergalen, Weitze y Topfer-Petersen (1995) determinaron en el plasma seminal de cerdos una fracción de 1-10 kDa de origen proteico no esteroidal, que al administrarlo transcervical permitió acortar en forma significativa el intervalo entre el comienzo del estro y la ovulación en cerdas, demostrando un efecto local de este componente del plasma seminal.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por Proyecto FONDECYT 1930777 (Chile) y CEE CI 1-CT92-0022. Durante el desarrollo del trabajo Luis del Valle fue Becario de PLACIRH PLC-05192 y de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

BIBLIOGRAFÍA

- BRAVO, P.W., STABENFELDT, G.H., FOWLER, M.E. y LASLEY, B.L. 1992. Pituitary response to repeated copulation and/or gonadotrophin-releasing hormone administration in llamas and alpacas. *Biol.Reprod.* 47: 884-888.
- BUSTOS-OBREGON, E., VAN RYSELBERGHE, N. y RODRIGUEZ, H. 1992. The role of FSH in adult rat spermatogonial proliferation. XIV World Congress on Fertil.Steril., Caracas. pp. 50-59.
- , PAOLICCHI, F. y URQUIETA, M. 1995. Ultraestructure of alpaca (*Lama pacos*) sperm. III IACEM and XV Microscopy Brasileian Simposium, Brasil.
- CHEN, B.X., YUEN, Z.X. y PAN, G.W. 1985. Semen induced ovulation in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J. Reprod. Fertil.* 47: 335-339.
- RIOS, M., SUMAR, J. y ALARCON, V. 1985. Presencia de un factor de inducción de ovulación en el semen de la alpaca y toro. Resúm. 8° Reunión Cient.Anu.Asoc. Peruana Prod.Anim., Huancayo, Perú: p 40
- SCOTT, R.S., BURGER, H.G. y QUIGG, H. 1980 A simple and rapid in vitro bioassay fq inhibin. *Endocrinology* 107: 1536-1542.
- SUMAR, J. 1993. Efectos de los estímulos de inducción en la ovulación de alpacas y llamas. *Rev.Pec.Inv. IVITA* 6:17-21.
- URQUIETA, B., PAOLICCHI, F. y BUSTOS OBREGON, E. 1995. Taller de Camélidos Sudamericanos. Balcarce.
- 1996. Caracterización del semen de alpaca (*Lama pacos*). Tesis Magister en Ciencia Biológicas. Escuela de Posgrado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago.
- WHO. 1989. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervic mucus interaction. Cambridge Universi Press. Cambridge. pp 67.
- ZHAO, XX., HUANG, Y.M. y CHEN, B.X. 199 Biological activity of gonadotrophin-realeasing hormone-like factors in the semi plasma of the bactrian camel. *Proc. 1 Int.Camel Conf.* pp. 163-168.

Volver a: [Reproducción camélidos](#)