

EFFECTO DE LA DIETA Y DE LA MELATONINA EXOGENA SOBRE LA RESPUESTA HIPOFISARIA A LA GnRH DURANTE EL ANESTRO Y LA ESTACION REPRODUCTIVA EN OVEJAS RASA ARAGONESA

Abecia, J.A., Forcada, F., Vázquez, M.I. y Palacín I.

Depto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza. alf@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La estacionalidad reproductiva de la oveja viene determinada por los cambios anuales del fotoperiodo, hecho que a su vez es regulado por la secreción nocturna de melatonina, cuya duración fluctúa a lo largo del año y que actúa a nivel de hipotálamo modulando la secreción pulsátil de GnRH (Karsch et al., 1984). Por otra parte, se ha demostrado que una subnutrición y/o una baja condición corporal producen cambios en la duración del anestro estacional en ovejas Rasa Aragonesa (Forcada et al., 1992). Además, el efecto de la melatonina sobre la tasa de ovulación es más pronunciado en ovejas subnutridas de la misma raza (Forcada et al., 1995). Nuestro grupo ha demostrado también que los mecanismos que relacionan el tratamiento con melatonina y la subnutrición en relación al desarrollo embrionario están regulados por la época del año (Vázquez et al., 2009), y que esta hormona mejora la competencia y el desarrollo oocitario particularmente en ovejas subnutridas (Vázquez et al., 2010). El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la interacción entre la melatonina exógena y la subnutrición sobre la respuesta hipofisaria a la GnRH, tanto en anestro como en la época de actividad sexual.

MATERIAL Y MÉTODOS

La experiencia se desarrolló en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, con procedimientos aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal. Se utilizaron 19 ovejas de raza Rasa Aragonesa ovariectomizadas cuatro meses antes del inicio del experimento, que recibieron un implante subcutáneo de 1,5 cm de silastic relleno de estradiol dos meses antes del inicio del experimento. Éste se planteó como un diseño factorial 2x2x2, con la dieta (control vs. subnutrición), el tratamiento o no con melatonina y la época del año (anestro vs. estación reproductiva) como factores del modelo. Al inicio del anestro estacional (A) (2 de marzo), 10 ovejas (grupo +Mel) recibieron un implante subcutáneo de melatonina (Melovine, CEVA Salud Animal, Barcelona), permaneciendo otras 9 ovejas como lote control (grupo -Mel), no tratado. El 25 de marzo, las ovejas fueron trasladadas a boxes individuales (1,30 m x 1,30 m) con el fin de iniciar un periodo de adaptación al nuevo alojamiento, siendo alimentadas en base a sus necesidades de mantenimiento. El 1 de abril las ovejas fueron divididas en dos lotes en función de la dieta recibida (1,5x (control, C) ó 0,5x (bajo, B) veces las necesidades de mantenimiento), de tal modo que los lotes experimentales, en función la dieta y del tratamiento o no con melatonina fueron: grupo C+Mel (n=6), grupo B+Mel (n=4), grupo C-Mel (n=4) y grupo B-Mel (n=5). En todo momento las ovejas permanecieron en total aislamiento de machos.

Con el fin de determinar la respuesta hipofisaria a la GnRH, basándose en la secreción de LH, el 21 de abril se tomaron muestras de sangre a través de catéteres colocados en la vena yugular, a intervalos de 10 min durante 3 h, comenzando a las 9:00 am. La concentración basal de LH se estimó como la media de las primeras 6 muestras, correspondientes a la primera hora de muestreo. Inmediatamente tras la extracción de la sexta muestra, se administró una única dosis de GnRH (20 ng/kg PV) por vena yugular, continuándose con la obtención de sangre durante las 2 horas posteriores (muestras 7-18). Al día siguiente todas las ovejas fueron trasladadas a un box común, recibiendo la dieta de mantenimiento. El mismo diseño experimental fue repetido durante la época reproductiva (ER), de modo que el 30 de septiembre la mitad de las ovejas fueron implantadas con melatonina, el 21 de octubre todas ellas fueron trasladadas a los boxes individuales, el 28 de octubre se iniciaron las dietas experimentales y el 18 de noviembre se procedió a la extracción de sangre. La respuesta hipofisaria a la GnRH se estimó como la diferencia entre la concentración plasmática de LH antes de la inyección de GnRH y la concentración más

elevada de LH observada después de la inyección (delta LH ó DLH). Se aplicó la fórmula trapezoidal para calcular el área bajo la curva de LH durante la primera hora tras la inyección (AUC1) y durante las 2 horas posteriores o área total (AUCT) (Rowland, 1989). Los niveles plasmáticos de LH fueron determinados por ELISA (Valares et al., 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó un efecto significativo de la dieta (C: $0,93 \pm 0,21$ ng/ml; B: $1,46 \pm 0,29$ ng/ml; $p < 0,05$) y de la estación (A: $0,96 \pm 0,19$ ng/ml; ER: $1,44 \pm 0,20$ ng/ml; $p < 0,05$) sobre las concentraciones basales medias de LH antes de la administración de GnRH sin efecto del tratamiento con melatonina (Tabla 1). La administración de GnRH, tanto en abril como en octubre, aumentó de manera brusca las concentraciones plasmáticas de LH en todos los grupos (Figura 1). La primera muestra de sangre tras la GnRH, fue significativamente más elevada ($p < 0,05$) en la época reproductiva ($3,51 \pm 0,32$ ng/ml) que en anestro ($2,57 \pm 0,25$ ng/ml), y en las ovejas no tratadas con melatonina ($3,39 \pm 0,34$ ng/ml) frente a las tratadas ($2,73 \pm 0,27$ ng/ml) ($p = 0,097$). En ambas épocas del año, el análisis de varianza factorial mostró una ausencia de efecto del tratamiento con melatonina o de la dieta recibida por el animal, para el valor de DLH. Sin embargo, se detectó un efecto de la estación para el valor de AUC1 (A: $13,82 \pm 1,34$; ER: $18,28 \pm 6,35$; $p < 0,05$) y AUCT (A: $35,68 \pm 3,00$; ER: $44,90 \pm 2,86$; $p < 0,05$), siendo el efecto de la dieta cercano a la significación para AUCT (B: $43,54 \pm 3,83$; C: $37,03 \pm 1,93$; $p < 0,1$).

Tabla 1. Concentraciones basales medias ($\pm$ E.E.) de LH (ng/ml) antes de la administración de GnRH en ovejas OVX + E2 tratadas (+Mel) o no (-Mel) con melatonina y alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 (B) veces las necesidades de mantenimiento, durante el anestro estacionario y la época reproductiva.

	Anestro		Época Reproductiva	
	+Mel	-Mel	+Mel	-Mel
C	$0,67 \pm 0,26$	$0,93 \pm 0,13$	$1,20 \pm 0,32$	$0,97 \pm 0,22$
B	$0,76 \pm 0,44$	$1,58 \pm 0,50$	$1,55 \pm 0,45$	$2,12 \pm 0,46$

En conclusión, se confirman las diferencias estacionales en la respuesta hipofisaria a la GnRH, provocadas por diferencias estacionales al feedback negativo del estradiol (Robinson et al., 1985). El tratamiento con melatonina no incrementó los niveles basales de LH, como ya hemos observado previamente (Forcada et al., 2003, 2007) ni ejerció ninguna influencia en la respuesta a la GnRH en ninguna de las dos dietas ofrecidas, quizás debido al aislamiento completo de los machos a lo largo de la experiencia (Zúñiga et al., 2002). Los mayores niveles basales de LH en los animales subnutridos, especialmente durante el anestro, coinciden con trabajos donde la subnutrición provocó una reducción de la frecuencia de pulsos pero un aumento de los niveles circulantes de LH, debido a una mayor amplitud de dichos pulsos, tanto en ovinos (Adam et al., 1997) como en roedores (Dong et al., 1993).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, C.L., Findlay P.A., Kyle, C.E. et al. 1997. J Endocrinol. 152: 329-337
- Dong, Q., Li, B., Rintala, H., et al. 1993. AJP - Endo. 265:304-313
- Forcada, F., Abecia, J.A. & Sierra, I. 1992. Small Rumin. Res. 8: 313-324
- Forcada, F., Zarazaga, L. & Abecia, J.A. 1995. Theriogenology 43: 1179-1193
- Forcada F., Abecia, J.A. & Zúñiga, O. 2003. Can. J. Anim. Sci. 83: 311-313
- Forcada, F., Abecia, J.A., Casao, A. et al. 2007. Theriogenology 67: 855-862
- Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., et al. 1984. Recent Prog. Horm. Res. 40: 185-232
- Rowland, T. 1989. Clinical pharmacokinetics.
- Valares, J.A., Abecia, J.A., Forcada, F., et al. 2007. Vet. Res. Comm. 31: 427-436
- Vázquez, M.I., Forcada, F., Casao, A., et al. 2009. Anim. Reprod. Sci. 112: 83-94
- Vázquez, M.I., Forcada, F., Casao, A., et al. 2010. Reprod. Dom. Anim. 45: 677-684
- Zúñiga, O., Forcada, F. & Abecia, J.A., 2002. Anim. Reprod. Sci. 72: 165-174.

Agradecimientos: DGA. Grupo A-26.

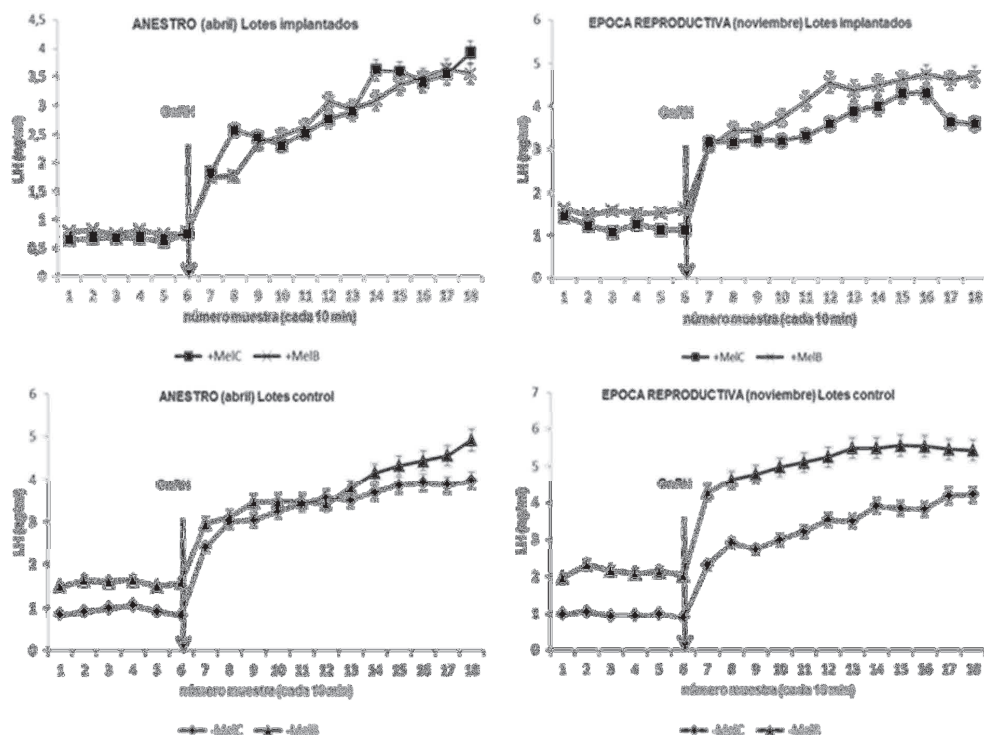


Figura 1. Niveles plasmáticos de LH (media $\pm$ E.S.) a lo largo de un muestreo seriado de sangre, durante 3 h a intervalos de 10 min, antes y después de la administración de GnRH (20 ng/kg) (flechas) en ovejas Rasa Aragonesa OVX + E2 tratadas (+Mel) o no (-Mel) con melatonina y alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 (B) veces las necesidades de mantenimiento, durante el anestro estacionario y la época reproductiva.

EFFECT OF LEVEL OF ENERGY AND EXOGENOUS MELATONIN ON PITUITARY RESPONSIVENESS TO GnRH IN RASA ARAGONESA EWES DURING ANESTRUS AND THE REPRODUCTIVE SEASON

ABSTRACT: In order to determine the effect of level of feed intake and exogenous melatonin on pituitary responsiveness to GnRH, both during anestrus (A) and breeding season (BS), 19 OVX+E2 ewes were used. Animals were divided in 4 groups, treated (+Mel) or not (-Mel) with melatonin and fed to provide 1.5 (Control, C) or 0.5 (low, B) times maintenance requirements. Both in April and November, a GnRH challenge was performed, consisting on collecting blood samples every 10 min for 3 h. After the first hour, GnRH was injected and LH analyzed. The highest LH single (DLH) and the area under the curve of the first h (AUC1) and the total period (AUCT) were calculated. There was a significant effect of diet (C: 0.93 ± 0.21 ; B: 1.46 ± 0.29 ; $p < 0.05$) and (BS: 1.44 ± 0.20 ; A: 0.96 ± 0.19 ng/ml; $p < 0.05$) on basal LH concentrations before GnRH challenge with no effect of melatonin. GnRH increased dramatically LH both in A and BS. DLH was not affected by melatonin, diet or season, although AUC1 and AUCT were significantly affected by season ($p < 0.05$). The highest basal LH levels showed by undernourished ewes could be due to an increment of LH pulse amplitude described in the literature.

Keywords: sheep, melatonin, undernutrition, season