

Evaluación de potencia de gonadotrofina coriónica equina (eCG) en ratas

Stalder V¹, Banega D¹, Rebelindo E¹, Gareis N¹, Velázquez N¹, Charaviglio J¹, Panzani CG¹.

¹ Centro de Medicina Comparada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina. /

E-mail: cpanzani@fcv.unl.edu.ar

La Gonadotrofina Corionica equina (eCG), originalmente llamada PMSG (del inglés *pregnant mare serum gonadotropin*), pertenece a la misma familia de hormonas glicoproteicas que la LH, FSH y TSH. Mientras que la LH y FSH son secretadas por la hipófisis en todas las especies de mamíferos, la eCG es producida en la copa endometrial de yeguas gestantes. La eCG puede desencadenar respuestas LH y FSH en especies diferentes a los equinos debido a su alta afinidad en el ovario por los receptores de LH y de FSH ^{1, 2, 3}. En este sentido, el potencial foliculogénico, que es un indicador de la actividad LH y FSH de la eCG, ha sido evaluado determinando el estímulo del desarrollo folicular y el número de ovulaciones en ratas inmaduras ⁴. Debido a la importancia de la eCG aplicada en biotecnología de la reproducción en veterinaria y conociendo los mecanismos de acción, en la industria se realizan importantes esfuerzos para mejorar la producción de la hormona. Uno de los pasos críticos es determinar su actividad para cuantificar su potencia en Unidades Internacionales (UI). El control de la potencia de las hormonas gonadotróficas, particularmente de la eCG se ha evaluado mediante ensayos estandarizados *in vivo* ³ y se ha protocolizado su análisis mediante un test descrito en la Farmacopea Europea 6.0. Allí se compara el efecto de la hormona desarrollada sobre el incremento de la masa de los ovarios de ratas inmaduras respecto al estándar internacional de la gonadotrofina equina sérica o una preparación de referencia calibrada en unidades internacionales utilizando dosis crecientes.

En el Centro de Medicina Comparada (CMC) (ICIVET Litoral, UNL /CONICET) se realizan ensayos biológicos con animales de laboratorio con un enfoque hacia la investigación aplicada y a la realización de servicios demandados por las empresas y grupos de investigación y desarrollo del sistema científico-tecnológico, bajo normas internacionales de ética y calidad en su uso y cuidado de animales de laboratorio. El CMC tiene implementado un sistema de gestión de calidad que se aplica a todas las áreas acorde a la norma ISO 9001 vigente. Este sistema de Calidad se encuentra reflejado en el Manual de Calidad y en los Procedimientos Operativos Estandarizados (POE), entre otros. Los POEs garantizan la uniformidad, reproducibilidad y consistencia de las características de los productos o procesos realizados a partir de los cuales se detallan funciones y responsabilidades. Los POEs son los procedimientos escritos que describen y explican cómo realizar una tarea para lograr un fin específico, de la mejor manera posible.

En base a esto, el objetivo del presente trabajo es describir el procedimiento general para realizar la evaluación de potencia de gonadotrofina coriónica equina (eCG) en ratas.

Se emplearon ratas hembras pre-púberes de la cepa Wistar/Cmedc de entre 21 a 28 días de edad, sin diferir en más de 3 días entre los animales seleccionados y una diferencia de peso de hasta 10g entre el más liviano y el más pesado. Los animales se dividieron aleatoriamente en 6 grupos de 5 animales cada uno, en jaulas debidamente preparadas y rotuladas de acuerdo a POEs, vigentes en el CMC. Los animales fueron identificados y se registró el peso previo al tratamiento y al finalizar el ensayo. Tanto el estándar de referencia internacional como la sustancia de ensayo fueron provistas por el comitente y se prepararon respetando los protocolos suministrados por este y de acuerdo a lo indicado por Farmacopea Europea 6.0. Se utilizaron 3 dosis de la preparación de referencia de la sustancia con potencia/actividad foliculoestimulante - luteinizante conocida y 3 dosis de la sustancia recibida con potencia eCG desconocida, de forma tal que la dosis menor sea capaz de producir respuesta positiva en alguna de las ratas, mientras que la dosis mayor no produzca el máximo efecto en todos los

VII JORNADA DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN

Noviembre 2019. Esperanza. Santa Fe. Argentina.

Área temática: **SALUD ANIMAL**

animales. Las dosis tienen una progresión geométrica, indicándose como aproximación inicial dosis de 8 UI, 12 UI y 18 UI totales, aunque éstas pueden variar según la sensibilidad de los animales a utilizar y los requerimientos del comitente. Estas dosis fueron determinadas por técnica analítica de la Farmacopea Europea 6.0. Luego se procedió a administrar las soluciones preparadas. Para esto, se midió el volumen de la solución a administrar en la jeringa, excluyendo las burbujas y se realizó administración subcutánea. Esta administración se repitió a las 18, 21, 24, 42 y 48h luego de la primera inyección. Los pesos de los animales, los cálculos de las sustancias a administrar y las actividades de administración se registraron en las planillas correspondientes.

Entre las 40 y las 72h luego de la última administración, se procedió al registro de peso, sacrificio de los animales y la extracción de los ovarios. Para ello se retiró el excedente de grasa y se extrajeron los ovarios completos sin ningún tejido anexo (trompas uterinas, útero, grasa). Ambos ovarios fueron colocados inmediatamente en una placa de Petri y pesados en una balanza analítica verificada previamente. Este procedimiento se realizó de manera rápida para evitar pérdidas por evaporación y se registró el peso de ambos.

Los datos obtenidos fueron volcados en una planilla de Excel para la realización de los cálculos correspondientes en relación a la estimulación lograda con las diferentes dosis y de este modo estimar la actividad de la hormona incógnita en comparación con los patrones.

Este ensayo, ha sido desarrollado y validado en el CMC, realizando anualmente más de 50 protocolos para diferentes empresas farmacéuticas veterinarias de Argentina y la región.

Estos datos permiten obtener información valiosa a ser considerada al momento de la formulación y comercialización de esta hormona para su uso. Los ensayos con animales de laboratorio no han podido ser reemplazados aun en relación a la evaluación de la potencia de este tipo de hormonas, es por esto que es fundamental realizar los ensayos respetando las normas de ética, con los cuidados y controles necesarios.

Bibliografía

- 1- Chopineau M, Maurel MC, Combarous Y y Durand P (1993). Topography of equine chorionic gonadotropin epitopes relative to the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor interaction sites. *Mol Cell Endocrinol*, 92(2), 229-239.
- 2- Kara E, Dupuy L, Bouillon C, Casteret S y Maurel MC (2019). Modulation of gonadotropins activity by antibodies. *Front Endocrinol*, 10.
- 3- Lecompte F, Harbeby E, Cahoreau C, Klett D y Combarous Y (2010). Use of the immature rat uterotrophic assay for specific measurements of chorionic gonadotropins and follicle-stimulating hormones in vivo bioactivities. *Theriogenology* 74(5),756-764.
- 4- Murphy BD y Martinuk SD (1991). Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*, 12(1), 27-44.