

Variaciones fotoperiódicas de las concentraciones plasmáticas de testosterona en conejo

G. Silván, J. C. Illera, J. Martín, R. Manjón y M. Illera*

Departamento de Fisiología animal
Facultad de Veterinaria. U.C.M.
28040 Madrid (España)

(Recibido el 17 de noviembre de 1989)

G. SILVÁN, J. C. ILLERA, J. MARTÍN, R. MANJÓN and M. ILLERA. *Photoperiodic Variations of Testosterone Plasmatic Levels in Rabbits*. Rev. esp. Fisiol., 46 (2), 177-182, 1990.

The photoperiodic variations of testosterone plasmatic levels in male rabbits have been studied. The animals were subjected to the influence of three circadian rhythms: 12/12, 14/10 and 10/14 h of light/darkness. The hormone assay was carried out using an enzymeimmunoassay method (Competitive ELISA). Blood samples were of two different types: seriated and non-seriated, to find if these might be any differences in the results. It is concluded that testosterone plasmatic levels are within physiologic values (0.3-10.0 ng/ml), although differences depending on the light/darkness cycle and on the type of blood extraction are remarkable; for this reason the selection of the circadian rhythm will depend on the experimentation that is to be carried out.

Key words: Photoperiod, Testosterone, Rabbits, Circadian rhythms.

La importancia de los lagomorfos dentro de la experimentación animal es de todos bien conocida ya que son utilizados en una gran variedad de campos experimentales, tales como Reproducción, Inmunología, Farmacología, Cirugía Experimental, entre otros.

Se puede señalar que, en el campo de la Reproducción, el conejo se viene utilizando para el desarrollo de las técnicas de fertilización *in vitro* y transferencia de embriones siendo necesario, en muchos casos, conocer el estado endocrino tanto del macho como de la hembra. También es importante determinar las condiciones de

alojamiento idóneas para esta especie, como son temperatura, ciclo de luz/oscuridad, humedad, etc. Dentro de estas condiciones ambientales se debe resaltar la influencia que el fotoperíodo ejerce sobre el fisiologismo de su aparato reproductor, ya que un alojamiento en condiciones inadecuadas puede dar lugar a un fallo total o parcial de los estudios reproductivos que se estén llevando a cabo.

En el campo de la Inmunología, esta especie juega un papel muy importante como animal productor de anticuerpos policlonales, frente a los más variados antígenos y haptenos; para tal fin, deben ser sometidos a una serie de extracciones sanguíneas con relativa frecuencia.

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

El objetivo de este estudio es, por un lado, determinar si existen variaciones en las concentraciones plasmáticas de testosterona en conejos de raza Nueva Zelanda utilizando tres ritmos circadianos distintos: 12 horas de luz y 12 de oscuridad, 14 horas de luz y 10 de oscuridad y 10 horas de luz y 14 de oscuridad; por otro lado, estudiar también las diferencias existentes en estos valores plasmáticos dependiendo de la manera de realizar las extracciones; es decir, seriadas o indeterminadamente.

Material y Métodos

Animales. — Se ha utilizado un total de 30 conejos machos, adultos, Blancos de Nueva Zelanda (BNZ) de un peso comprendido entre 3 y 5 kg, alojados en jaulas individuales, de acero inoxidable (48 × 61 × 46 cm), en una habitación de ambiente controlado, con temperatura de 20 a 22 °C, humedad relativa del 50-55 % y una renovación del aire de 10 a 15 cambios/h. El alimento fue administrado en forma de «pellets» (150 g por animal/día) y el agua de bebida *ad libitum*.

Los animales se sometieron a un período de aclimatación, de al menos 15 días, para adaptarse a los cambios de ciclo luz/oscuridad.

Extracciones sanguíneas. — Para cada uno de los experimentos, se formaron dos grupos de 15 conejos cada uno:

- 1) Las tomas de muestras se hicieron seriadamente a las 8, 12, 16, 20 y 24 horas.
- 2) Las extracciones se hicieron a las mismas horas que en el grupo anterior, pero empleando cada vez animales diferentes, aunque en cada animal se realizaran varias tomas, en días distintos. Por esta razón, fueron denominadas extracciones no seriadas.

En todos los casos la sangre se extrajo de la arteria central de la oreja (6), utilizando los restantes vasos sanguíneos de la oreja cuando esta arteria quedaba colap-

sada. En cada extracción se obtuvieron, aproximadamente, 5 ml de sangre que se centrifugó a $1.200 \times g$ a 4 °C, durante 20 min, con un rendimiento aproximado de 2 a 3 ml de plasma, el cual se conservó a -20 °C hasta su posterior análisis.

Análítica hormonal. — Se ha empleado el método enzimoimmunoanalítico ELISA de competición (9), con las modificaciones necesarias para este estudio y que se detallan más adelante.

Antes de proceder al análisis hormonal de las muestras obtenidas, se preparó una curva estándar a la cual se refirieron posteriormente los resultados de las muestras. En la figura 1, se representa la curva estándar para testosterona plasmática; la sensibilidad se sitúa entre 0,1 pg y 1,0 ng/pocillo. Para el desarrollo de la técnica se han utilizado placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos (Dynatech). Se tapizaron los pocillos de la placa con un anticuerpo policlonal específico anti-testosterona, producido en nuestro laboratorio (4) y la reacción cruzada que presentaba fue del 100 % para testosterona, 1 % para dihidrotestosterona, 0,1 % para androstenediona y < 0,01 para progesterona, cortisol, estrona y estradiol. Siendo el título de este anticuerpo de 1/4.000. Después de una incubación durante toda la noche a 37 °C, para que el anticuerpo quede adsorbido a la pared de los pocillos, se lavó la placa para eliminar el anticuerpo que no hubiese quedado adsorbido.

Posteriormente, se añadieron una serie de muestras estándar y las muestras problema, por triplicado. Ambas se diluyeron en solución de conjugado, formado por testosterona (Steraloids Inc.) marcada con peroxidasa (Boehringer), a la dilución de 1/60.000. Para que la reacción de competición tuviera lugar se incubaron las placas durante 2 h, al cabo de las cuales se realizó un lavado, para eliminar las fracciones de muestra problema y de conjugado que no hubiesen reaccionado con el anticuerpo.

Por último, se adicionó el sustrato: peróxido de hidrógeno (Merck) y OPD (ortofenilén-diamina, Dakopatts), para revelar la reacción, que se cuantificó, posteriormente, en un lector de ELISA (Dynatech) a una longitud de onda de 492 nm.

Los resultados fueron procesados mediante un programa de ordenador especialmente diseñado para la técnica ELISA (Departamento de Informática, Universidad de California, Davis) y para el análisis estadístico se utilizó el Biomedical Data Program (BMDP).

Resultados y Discusión

La influencia de los ritmos circadianos sobre el estado reproductivo y las fluctuaciones de los valores plasmáticos de las hormonas esteroides, han sido estudiadas en casi todas las especies de animales de laboratorio: ratón (3), rata (1), hamster (7) y en otros mamíferos (8, 11).

La elección del conejo como animal de experimentación fue debida a que la mayoría de los estudios han sido orientados para conocer el estado reproductor de esta especie y no a la influencia que los diferentes ritmos circadianos ejercen sobre los niveles plasmáticos de hormonas esteroides.

La manera de realizar la extracción sanguínea y, sobre todo, el tiempo que trans-

curre entre una y otra toma debería influir en los valores plasmáticos de esta hormona. Para su comprobación se estudiaron también las diferencias existentes en estos valores, dependiendo de si la toma fue o no seriada.

Las concentraciones de testosterona en plasma, medidas en todas las condiciones de la experimentación, se encuentran dentro del margen fisiológico (0,3-10,0 ng/ml), si bien existen grandes diferencias dependiendo del ciclo luz/oscuridad y del tipo de extracción realizado (tabla I).

Por lo que respecta al ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, se ha observado que los valores de hormona van aumentando a lo largo del día, según el número de extracciones seriadas practicadas a los animales. En las tomas no seriadas, los valores son más altos en la primera muestra y van disminuyendo paulatinamente a lo largo del día, siendo el valor mínimo a las 20,00 h ($0,84 \pm 0,15$ ng/ml), para luego aumentar de nuevo en la siguiente extracción (a las 24,00 h: $2,84 \pm 0,54$ ng/ml) (fig. 1). Esta fluctuación en las concentraciones de testosterona concuerda con lo descrito por MOORADIAN *et al.* (8) en su estudio sobre el papel biológico de los andrógenos en distintas especies animales y en el hombre.

En el ciclo 14/10 la evolución de los valores plasmáticos de testosterona es similar a lo que ocurría en el ciclo 12/12 en las

Tabla I. Concentraciones plasmáticas medias (\pm ESM) de testosterona en muestras seriadas y no seriadas durante los distintos ritmos circadianos.

Ciclo	Extracción	8,00 h	12,00 h	16,00 h	20,00 h	24,00 h
12/12	Seriada	$2,70 \pm 0,30$	$3,40 \pm 0,46$	$3,91 \pm 0,26$	$4,14 \pm 0,18$	$5,16 \pm 0,42$
	No seriada	$3,31 \pm 0,16$	$2,64 \pm 0,28$	$1,50 \pm 0,46$	$0,84 \pm 0,15$	$2,84 \pm 0,54$
14/10	Seriada	$2,14 \pm 0,40$	$3,10 \pm 0,12$	$3,80 \pm 0,05$	$4,25 \pm 0,15$	$4,75 \pm 0,56$
	No seriada	$2,25 \pm 0,35$	$2,50 \pm 0,26$	$3,87 \pm 0,10$	$1,40 \pm 0,22$	$0,80 \pm 0,18$
10/14	Seriada	$4,71 \pm 0,20$	$3,25 \pm 0,18$	$0,63 \pm 0,30$	$4,26 \pm 0,40$	$3,23 \pm 0,31$
	No seriada	$4,31 \pm 0,28$	$2,80 \pm 0,21$	$0,71 \pm 0,16$	$3,20 \pm 0,36$	$1,23 \pm 0,60$

$p < 0,01$

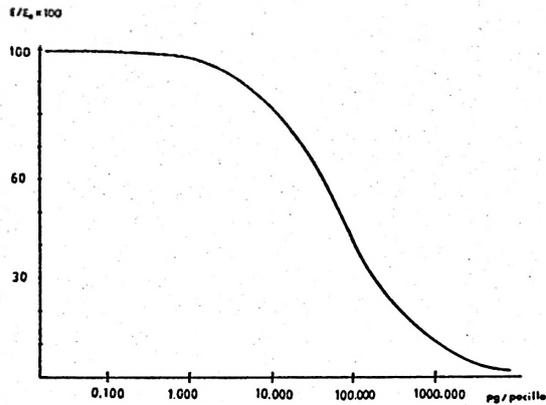


Fig. 1. Curva estándar de testosterona.

extracciones seriadas, aunque aquí son un poco inferiores a los determinados en el primer ciclo y, sobre todo, el aumento que se producía a las 24,00 h es menor. Por lo que se refiere a las muestras no seriadas, estas concentraciones se mantienen a un mismo nivel en las dos primeras tomas, aumentan en la extracción de las 16,00 h y luego vuelven a disminuir en las dos últimas muestras (fig. 2). Los valores encontrados están dentro de los márgenes indicados por otros autores (5, 10), para este ciclo y esta especie (de 0,1 a 4,0 ng/ml), aunque ellos solamente realizan una ex-

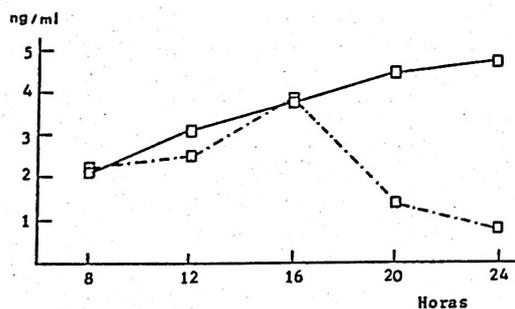


Fig. 2. Variación de las concentraciones plasmáticas de testosterona de muestras seriadas (—) y no seriadas (- - -) (ciclo 12/12).

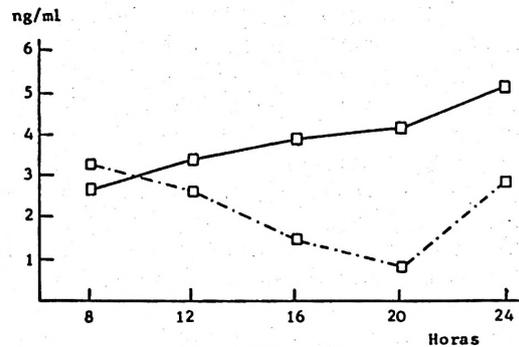


Fig. 3. Variación de las concentraciones plasmáticas de testosterona de muestras seriadas (—) y no seriadas (- - -) (ciclo 14/10).

tracción a primeras horas de la mañana (9,00 h) y mediante punción intracardiaca.

El último de los ciclos, 10 h de luz y 14 h de oscuridad, es el que presenta mayores diferencias respecto a los otros dos ciclos estudiados, en cuanto a las concentraciones de testosterona y sus fluctuaciones a lo largo del día, no produciéndose variaciones significativas entre muestras seriadas y no seriadas, aunque existen diferencias dependientes del tipo de extracción.

En las extracciones seriadas de este ritmo circadiano, las concentraciones de testosterona van disminuyendo hasta alcanzar su valor mínimo a las 16,00 h, aumentando hasta unos valores similares a los iniciales en la extracción de las 20,00 h. En las extracciones no seriadas los valores son más bajos, encontrándose las mayores diferencias en la extracción de las 24,00 h, con cifras que disminuyen hasta $1,23 \pm 0,60$ ng/ml (fig. 3). Las concentraciones plasmáticas de testosterona encontradas en nuestro estudio son inferiores a las señaladas por BLAKE *et al.* (2) (0,50-15,00 ng/ml), utilizando el mismo ritmo circadiano, aunque esto se puede explicar porque estos autores realizan las extracciones después de haber puesto el macho en presencia de la hembra, inmediatamente antes de realizar la monta y previa administra-

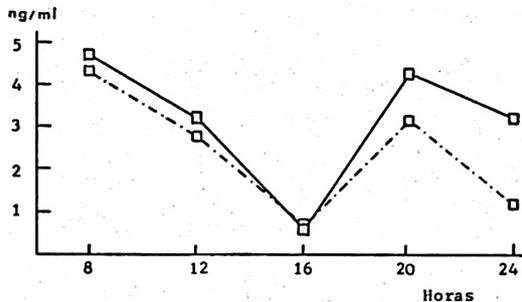


Fig. 4. Variación de las concentraciones plasmáticas de testosterona de muestras seriadas (—) y no seriadas (-.-) (ciclo 10/14).

ción de una inyección de LH-RH (50 µg).

Las diferencias encontradas en la experimentación entre los tres ritmos circadianos son más marcadas en las muestras no seriadas: en el ciclo 12/12, considerado por la mayoría de los autores como el «más idóneo» para esta especie, los valores van disminuyendo lentamente a lo largo del día, para aumentar en la toma de las 24,00 h. En el ciclo 14/10, las concentraciones son más altas a las 16,00 horas y mínimas a las 24,00, quizá porque al aumentar el número de horas de luz todavía no se ha producido la subida nocturna de estos valores que sí se había experimentado a la misma hora en el ciclo 12/12. Por último, en el ciclo 10/14 se observa que los valores mínimos de concentración son los de las 16,00 h y los máximos los de las 20,00 h, siendo la explicación la misma que en el caso anterior, puesto que al acortar el número de horas de luz, a las 20,00 h ya se habrá producido la subida nocturna de las concentraciones plasmáticas de testosterona.

Concluyendo, las concentraciones plasmáticas de testosterona se encuentran dentro del margen fisiológico en todos los ritmos circadianos estudiados, si bien experimentan grandes variaciones en cada uno de ellos, por lo que la elección, de un ritmo u otro, dependerá en cada caso del tipo de estudio o experimentación que se vaya

a realizar. En nuestra opinión, el ciclo que se debe aportar, siempre y cuando la experimentación no esté específicamente dirigida hacia un problema endocrinológico, es el de 10 horas luz y 14 oscuridad y, siempre que se deseen niveles de testosterona más altos, se deberán obtener las muestras a primeras horas de la mañana.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a la Profesora Coralie Munro, del «Department of Reproduction de la University of California, Davis (USA)», por la colaboración y ayuda que nos prestó para la realización de este trabajo.

Este estudio ha sido subvencionado, parcialmente, por una ayuda de la extinta C.A.I.C.Y.T.

Resumen

Se estudian las variaciones fotoperiódicas de las concentraciones plasmáticas de testosterona en conejos sometidos a la influencia de tres ritmos circadianos distintos: 12/12, 14/10 y 10/14 horas de luz/oscuridad. El análisis hormonal se realizó con la técnica inmunoenzimática ELISA de competición. Las extracciones sanguíneas son seriadas y no seriadas, para comprobar si existe alguna diferencia en los resultados, por influencia del tipo de extracción. De los resultados obtenidos se deduce que los niveles plasmáticos de testosterona se encuentran dentro de los valores fisiológicos (0,3-10 ng/ml) si bien en cada ciclo luz/oscuridad, y dependiendo del tipo de extracción, las diferencias son notables, por lo que la elección de uno u otro ritmo circadiano dependerá de la experimentación que se vaya a realizar con esta especie animal.

Palabras clave: Fotoperíodo, Testosterona, Conejos, Ritmos circadianos.

Bibliografía

1. Albers, H. E., Gerall, A. A. y Axelson, J. F.: *Physiol. Behav.*, 26, 21-25, 1981.
2. Blake, C. A., Blake, P. K., Thorneycroft, N. K. y Thorneycroft, I. H.: *J. Endocr.*, 76, 417-425, 1978.
3. Daan, S., Damassa, D., Pittendrigh, C. S. y

- Smith, E. R.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 3744-3747, 1975.
4. Dawson, E. C., Denissen, E. H. C. y van Weemen, B. K.: *Steroids*, 31, 357-366, 1978.
 5. Falvo, R. E. y Nalbandov, A. V.: *Endocrinology*, 95, 1466-1469, 1974.
 6. Illera, J. C., Silván, G. e Illera, M.: *Actas II Congreso SEEA*, 1989.
 7. Krey, L. C. y Bittman, E. L.: *Proc. 18th Annual Meeting Soc. Study Reprod.*, 32, 161, 1985.
 8. Mooradian, A. D., Morley, J. E. y Korenman, S. G.: *Endocr. Rev.*, 8, 1-28, 1987.
 9. Munro, C. y Stabenfeldt, G.: *J. Endocr.*, 101, 41-49, 1984.
 10. Schanbacher, B. D. y Ewing L. L.: *Endocrinology*, 97, 787-792, 1975.
 11. Wollnik, F.: *Lab. Anim.*, 23, 107-125, 1989.