

## **Evaluación de la acción de un antagonista de receptores gabaérgicos sobre la secreción de hormona luteinizante, antes, durante y después de un ayuno en ovejas prepúberes\***

Evaluation of a gaba receptor antagonist on luteinizing hormone secretion before, during and after fasting in ewe lambs

S. E. RECABARREN, M.Sc.; A. LOBOS, M.V. Mg Sc.; M. ARAYA, M.V.; V. DÍAZ, M,V.; J. A. PARILO, Ag.  
Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Animal, Facultad de Medicina Veterinaria,  
Universidad de Concepción, Campus Chillán.

### **SUMMARY**

The objective of this study was to assess the effect of a GABA receptor antagonist, (Bicuculline) on the pulsatile LH secretion before, during and after fasting in ewe lambs. Five Suffolk ewe lambs of 20 weeks of age were subjected to fasting for 8 days. A study of LH pulsatility was performed before (day 0), after one and eight days of fasting and 48 hours after the end of fasting. This study consisted in collecting blood samples by means of an indwelling jugular vein catheter at 10 min intervals for 10 hours from 9am onwards hours. Five hours after the start of the pulsatility study, a bolus of Bicuculline (50 ug/kg BW) was given intravenously. Thus, the 10-hours study period was divided in two phases of 5-hours each: before and after bicuculline. Parameters of the LH secretion were determined by the CLUSTER program independently for both phases and compared by paired t-test. Basal parameters of LH secretion on each day of the study were analyzed with ANOVA for repeated measures and comparison of the means with the Newman Keuls's test. Body weight was recorded and basal levels of blood glucose, insulin and cortisol were also obtained before, during and after fasting.

Body weight and basal plasma glucose concentrations decreased significantly after 8 days of fasting, however, insulin and cortisol did not change. Parameters of pulsatile LH secretion did not change with fasting or after 48 hours of refeeding. Bicuculline tended to increase ( $p < 0.06$ ) both mean plasma concentrations and amplitude of LH pulses before fasting (Day 0), but it had no effect on LH secretion on day 1, 8 of fasting or after two days of refeeding.

Results suggest that GABA may be involved in the control of LH secretion in normally fed ewe lambs, however this control is not apparent during fasting. Fasting has an impact on body weight and plasma glucose concentrations but no effect on basal plasma levels of insulin. Plasma cortisol concentrations did not change suggesting that fasting did not evoke a stress condition.

*Palabras claves:* borregas, bicuculina, ayuno, LH, glucosa, insulina, cortisol.

*Key words:* ewe lambs, bicuculline, fasting, LH, glucose, insulin, cortisol.

---

Aceptado:

\*Trabajo financiado por Proyecto DIUC 97.153.007 y DIUC 98.153.008.

## INTRODUCCION

En las hembras de los mamíferos, los procesos reproductivos son sensibles a la disponibilidad de energía. Una restricción natural o experimental en la disponibilidad de alimento puede conducir a una disminución en la fertilidad. Uno de los primeros cambios que se observan en estas condiciones es una disminución de la secreción de la hormona luteinizante (LH) (Foster y Olster, 1985, Foster y col., 1985), alterándose tanto la fisiología reproductiva como el comportamiento sexual.

El sitio primario de la alteración de la función reproductiva en la infertilidad nutricional parece ser el hipotálamo, comprometiendo las neuronas secretoras de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Schillo, 1992), pero sin influir en la capacidad de respuesta de la hipófisis a sus pulsos. (Kile y col., 1991).

Existe poco conocimiento de cómo se transmite la información del estatus nutricional hacia el hipotálamo y de qué forma es traducida en una señal neuroendocrina. Frente a este cuadro de reducción en la liberación de GnRH/LH, se ha planteado que existen señales que informarían al hipotálamo el estado metabólico de la hembra para modificar la secreción de GnRH (Wade y col., 1996).

Estas señales metabólicas llegarían al hipotálamo e informarían al centro generador de pulsos de GnRH, acerca del estado metabólico de la hembra con el fin de regular su secreción, y por lo tanto de LH. Dentro de estas señales metabólicas se han propuesto hormonas metabólicas tales como la insulina, hormona del crecimiento (GH), leptina o colicistoquinina (CCK), y también a aminoácidos, los cuales pueden servir como precursores de neurotransmisores (Recabarren y col., 1996). Las potenciales señales metabólicas serían captadas por sensores ubicados en el sistema nervioso central y a través de neurotransmisores alcanzarían hasta las neuronas que componen el centro generador de pulsos de GnRH. Entre los neurotransmisores se ha propuesto la participación de péptidos opioides; éstos modulan la secreción de GnRH/LH y además controlan el centro del

apetito y la saciedad (Morley, 1987). Sin embargo, algunas evidencias experimentales sugieren que los opioides podrían tener un rol secundario en la inhibición de la secreción de GnRH en ovinos, debido a que la administración de un pulso o la infusión de Naloxona, un antagonista de receptores opioides, no aumentó las concentraciones de LH en borregas con restricción alimenticia (Recabarren y col., 1990, Recabarren y col., 1999). Esto sugiere que otras vías inhibitorias se activarían durante la restricción alimenticia o el ayuno, las que en forma paralela reducen la secreción de GnRH/LH, de tal forma que, aunque se bloquee la inhibición opioidérgica, se mantiene la inhibición sobre la secreción de GnRH.

Entre los neurotransmisores relacionados con la regulación de la liberación de GnRH, se destaca el ácido gamma aminobutírico (GABA). El GABA ejerce una potente acción inhibitoria sobre las neuronas secretoras de GnRH (Herbison y Dyer, 1991; Scott y Clarke, 1993b; Ferreira y col., 1998). De acuerdo a esto, es posible que bajo condiciones de subalimentación o ausencia de alimentación, la actividad gabaérgica sea parte de los mecanismos supresores de la secreción de GnRH y como resultado de ello, disminuya la secreción de LH.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del ayuno sobre el peso corporal y las concentraciones basales de insulina y glucosa, y el efecto de la administración de bicuculina, un antagonista de receptores A gabaérgicos (GABAA) sobre la secreción pulsátil de hormona luteinizante antes, durante, y después de un ayuno de 8 días en ovejas prepúberes.

## MATERIALES Y METODOS

*Procedimientos generales.* Se utilizaron 5 borregas Suffolk Down nacidas en septiembre, provenientes de la Unidad de Producción Ovina de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción.

Las borregas se destetaron a las ocho semanas de edad y se mantuvieron en pradera, suplementándolas con alimento peletizado hasta las 20 semanas, edad en la cual comenzaron los experimentos.

Tres días antes de los experimentos, las borregas se trasladaron a la sala de experimentación, donde se colocaron en bretes individuales con libre acceso al alimento y agua. Se procedió a cateterizar ambas venas yugulares bajo anestesia local con catéteres Mediziv G18, de acuerdo a lo descrito anteriormente (Recabarren y col., 1992). Se procedió a realizar muestreos sanguíneos el día anterior al inicio del experimento con el fin de minimizar los riesgos de estrés. El ayuno consistió en retirar la alimentación por 8 días, permitiéndose libre acceso al agua. El ayuno se inició el día 0, inmediatamente después del primer estudio de pulsatilidad de LH, y se prolongó hasta el día 8. Las borregas se pesaron el día 0, el día 1 y 8 de ayuno y el día 10 del ensayo, es decir el segundo día de realimentación, con una balanza electrónica Rudweigg®. Con estos datos se calculó la dosis total de bicuculina por oveja y se determinó el efecto del ayuno sobre el peso corporal.

*Estudio de pulsatilidad de LH.* En el día 0, 1, y 8 de ayuno y 2 días después de finalizado éste, se estudiaron las características de la pulsatilidad de LH antes y después de la administración de un pulso de bicuculina endovenosa (BIC, 50 µg/kg. de peso vivo). Para ello, se colectaron muestras de sangre cada 10 min a partir de las 09:00 AM por 10 horas. A la quinta hora, se administró un pulso de BIC. Con este procedimiento, se tuvo 2 períodos: uno antes de la BIC, designado como período basal, y otro post-administración de BIC denominado período experimental.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos heparinizados mantenidos en hielo. La muestra al tiempo 0 se dividió en dos alícuotas, una de las cuales se depositó en un tubo heparinado y la otra en uno fluorado para la determinación de la glucosa basal. Todas las muestras se centrifugaron a 1000 g por 15 min a 4° C. El plasma se colectó y se guardó congelado a -20°C hasta la determinación de las concentraciones plasmáticas basales de insulina, cortisol y glucosa.

*Determinación de las concentraciones plasmáticas de LH, insulina, glucosa y cortisol.* Las concentraciones plasmáticas de LH se determinaron por medio de radioinmunoanálisis (RIA), con el método del doble anticuerpo, de acuerdo a los procedimientos ya descritos anteriormente (Recabarren y col., 1996). Todas las muestras se procesaron en volúmenes de 200 µL, en duplicado. El coeficiente de variación intraensayo e interensayo fue de 6 y 11% respectivamente en el rango medio de la curva, con un nivel de detectabilidad de 0, 1 ng/mL, definido como el 90% del buffer control.

La determinación de las concentraciones basales de insulina se realizó mediante RIA, de acuerdo a procedimientos descritos anteriormente (Recabarren y col., 2000), con un coeficiente de variación intraensayo de 3% y un nivel de detectabilidad de 5 µUI/mL, definido como el 90% del buffer control.

La cuantificación de cortisol plasmático se realizó mediante RIA, utilizando kits comerciales (DPC, Coat-A-Count), con un coeficiente de variación intraensayo de 5% y un nivel de detectabilidad de 3 µg/dL, definido como el 90% del buffer control.

La medición de glucosa se realizó a través del método enzimático de la glucosa oxidasa, usando kits comerciales (WIENER LAB®).

*Determinación de las características de la secreción pulsátil de LH.* Las características de la pulsatilidad de LH se determinaron mediante el uso de un programa computacional denominado CLUSTER, desarrollado por Veldhuis y Johnson (1986). Este programa permite identificar, mediante un algoritmo reiterativo, las fluctuaciones hormonales (pulsos) estadísticamente significativas en una serie de muestras consecutivas, utilizando como parámetro de identificación el coeficiente de variación del RIA, la frecuencia de muestreo, la forma definida del pulso asignada por el operador, (usando 1 o más puntos para el pico o uno o más puntos para el nadir), y las diferencias estadísticas entre puntos. El programa además identifica la amplitud media de los pulsos, el intervalo entre pulsos, la duración de los pulsos

y el nadir. Para la identificación de los pulsos de LH se escogió una forma de pulso de 1x2 para definir el máximo y el mínimo respectivamente con un test de t de 2.4. Con este procedimiento las probabilidades de identificar un falso positivo fue menor de 5%.

*Análisis estadístico.* Los valores promedio de concentración de LH (número de pulsos/5h), obtenidos con el programa computacional CLUSTER, se compararon entre los periodos basal y experimental de cada día del ensayo, mediante el test de t- pareado. Además, los parámetros basales de secreción de LH se analizaron con ANDEVA para muestras repetidas entre los días del experimento, mediante el programa estadístico GBStat, con comparación entre los promedios con el test de Newman Keuls.

Los cambios en el pesos vivo, concentraciones basales de insulina, cortisol y glucosa se analizaron por ANDEVA para muestras repetidas con comparación de los promedios con el test de Newman Keuls. Se consideró un  $P < 0.05$  como estadísticamente significativo. Los datos se entregan como promedio  $\pm$  error estándar.

## RESULTADOS

*Evaluación del efecto del ayuno sobre el peso corporal.* La variación de los pesos corporales de las borregas durante los días de experimentación

se presenta en el cuadro 1. El peso promedio de las borregas disminuyó entre los días 0 y 1 de ayuno con respecto al día 8 y 10 (2° día de realimentación) ( $P < 0.05$ ). Por otro lado, la restauración alimenticia permitió una ganancia de peso de 1 kilo en 2 días, siendo el peso del día 10 significativamente superior al del día 8 ( $P < 0.05$ ).

*Evaluación del efecto ayuno sobre las concentraciones plasmáticas basales de glucosa, insulina y cortisol.* En el cuadro 2 se entregan los resultados de las concentraciones plasmáticas promedio de glucosa, insulina y cortisol. La glucosa disminuyó entre el día 0 y 1 de ayuno y el día 8 ( $p < 0.05$ ), aumentando nuevamente una vez que las ovejas fueron realimentadas. Las concentraciones plasmáticas de insulina

**CUADRO 1. Promedios ( $\pm$  ee) de peso corporal (kg) en borregas antes (día 0) durante (días 1 y 8) y después del ayuno (día 10).**

Body weight mean ( $\pm$  s.em.) before fasting (day 0), during, (day 1 and 8) and after fasting in ewe lambs.

Días Days	Peso Vivo (kg) Body weight (kg)
0	34.8 $\pm$ 0.76a
1	34.8 $\pm$ 0.76
830.4	$\pm$ 0.46b
10	31.4 $\pm$ 0.46

a, b  $P < 0.05$

**CUADRO 2. Promedios de concentraciones plasmáticas basales de glucosa, insulina y cortisol previo (día 0), durante (días 1 y 8) y después de 2 días de realimentación (día 10) en borregas (promedio  $\pm$  error estándar).**

Basal plasma glucose, insulin and cortisol concentrations before (day 0), during, (Days 1 and 8) and after 2 days of refeeding (day 10) in ewe lambs (mean  $\pm$  s.e.m.).

Día Day	Glucosa (g/L) Glucose (g/L)	Insulina ( $\mu$ UI/mL) Insulin ( $\mu$ UI/mL)	Cortisol ( $\mu$ g/dL) Cortisol ( $\mu$ g/dL)
0	0.59 $\pm$ 0.0036a	9.38 $\pm$ 0.57	1.5 $\pm$ 0.36
1	0.56 $\pm$ 0.0033b	7.62 $\pm$ 0.98 a	0.92 $\pm$ 0.21
80.51	$\pm$ 0.0033b	10.88 $\pm$ 1.41	1.99 $\pm$ 0.7
10	0.58 $\pm$ 0.0041a	15.39 $\pm$ 2.54 b	1.79 $\pm$ 0.93

a, b  $P < 0.05$

disminuyeron levemente entre el día 0 y 1 de ayuno, pero no se diferencian estadísticamente entre los días 0, 1, y 8. El aumento de insulina plasmática el día 10, dos días después de iniciada la realimentación, es estadísticamente significativa con respecto al día 1 de ayuno ( $P < 0.05$ ). Las concentraciones plasmáticas de cortisol no se modificaron producto del ayuno.

*Evaluación del efecto ayuno y la bicuculina sobre el patrón de secreción de LH.* Como se puede observar en el cuadro 3 la concentración promedio de LH no se diferencia entre antes, durante y después del ayuno. De igual forma, la frecuencia de pulsos no se diferenció entre los días 0, 1, y 8 de ayuno, sin embargo, la amplitud disminuyó significativamente entre el día 0 y el día 8 de ayuno ( $p < 0.05$ ). El nadir no sufrió cambios significativos por efecto del ayuno.

La administración de un pulso de bicuculina tendió a aumentar las concentraciones promedio de LH, con respecto al período basal antes del inicio del ayuno (día 0) (cuadro 4). El promedio durante el período basal fue de  $0.26 \pm 0.04$  ng/mL/5 horas, tendiendo a aumentar significativamente en respuesta al pulso de BIC durante el período experimental ( $0.43 \pm 0.08$  ng/mL/5horas,  $P = 0.06$ ). La amplitud de los pulsos de LH también tendió a aumentar en respuesta al pulso de bicuculina ( $P = 0.08$ ). El nadir no se diferenció entre ambos períodos.

## DISCUSION

Los resultados del presente estudio muestran que el peso corporal y la glucosa descienden con el ayuno, recuperándose con la realimentación. Por el contrario, la insulina plasmática no se modifica con el ayuno, sin embargo, se observó un pequeño pero significativo aumento con la realimentación respecto del primer día de ayuno. El cortisol plasmático no cambió con el ayuno. Estos resultados confirman estudios anteriores de nuestro grupo, en los cuales se demostró que la concentración basal de glucosa plasmática disminuye significativamente con el ayuno, con una disminución no significativa de la insulina y sin cambios en las concentraciones plasmáticas de cortisol (Recabarren y col., 1999), pero con una caída drástica en la sensibilidad tisular a la insulina (Recabarren y col., 2000). Estos datos sugieren que en la borrega, la defensa homeostática frente al ayuno se dirige a la relación glucosa-insulina, modificando la sensibilidad a la insulina (Recabarren y col., 2000), para conservar el aporte energético a los tejidos sin una participación importante del cortisol como hormona gluconeogénica. Paralelamente, la conservación de las concentraciones plasmáticas de cortisol sugiere que el ayuno no podría considerarse como un estrés alimentario (I'Anson y col., 1994), a diferencia de lo que ocurre en roedores o

**CUADRO 3. Efecto del ayuno sobre las características de la secreción pulsátil de LH antes (día 0), durante (día 1 y 8) y después de 2 días de realimentación en borregas (promedio  $\pm$  error estándar).**

**Effect of fasting on the pulsatile LH secretion characteristics before (day 0), during (days 1 and 8) and after 2 days of refeeding (day 10) in ewe lambs (mean  $\pm$  s.e.m.).**

Días	Concentración promedio (ng/mL/5h)	Frecuencia (n° pulsos/5h)	Amplitud (ng/mL)	Nadir (ng/mL)
Days	Mean concentration (ng/mL/5h)	Frequency (n° pulses/5h)	Amplitude (ng/mL)	Nadir (ng/mL)
0	$0.26 \pm 0.04$	$2.6 \pm 0.51$	$0.70 \pm 0.24$	$0.1 \pm 0.0$
1	$0.26 \pm 0.06$	$3.4 \pm 0.51$	$0.50 \pm 0.24$	$0.12 \pm 0.02$
80.21	$\pm 0.06$	$2.4 \pm 0.6$	$0.15 \pm 0.02$	$0.10 \pm 0.0$
10	$0.25 \pm 0.10$	$3.2 \pm 0.73$	$0.48 \pm 0.280.16$	$\pm 0.04$

**CUADRO 4. Características de la secreción de LH, pre y post administración endovenosa de un pulso de bicuculina antes (día 0), durante (días 1 y 8) y 2 días después de un ayuno (día 10) en borregas (promedio  $\pm$  error estándar).**

Characteristics of LH secretion, pre- and post-administration of an endovenous pulse of bicuculline before (day 0), during (day 1 and 8) and 2 days after ending fast (day 10) in ewe lambs (mean  $\pm$  s.e.m.).

		Promedio Mean (ng/mL/5h)	Frecuencia Frequency (n° pulsos/5h)	Amplitud Amplitude (ng/mL)	Nadir Nadir (ng/mL)
Día 0	Pre	0.26 $\pm$ 0.04 a	2.6 $\pm$ 0.51	0.70 $\pm$ 0.24c	0.10 $\pm$ 0.0
Day 0	Post	0.43 $\pm$ 0.08 b	3.2 $\pm$ 0.49	1.08 $\pm$ 0.38d	0.26 $\pm$ 0.1
Día 1	Pre	0.26 $\pm$ 0.06	3.4 $\pm$ 0.51	0.50 $\pm$ 0.24	0.12 $\pm$ 0.02
Day 1	Post	0.27 $\pm$ 0.17	2.8 $\pm$ 0.86	0.53 $\pm$ 0.37	0.12 $\pm$ 0.02
Día 8	Pre	0.21 $\pm$ 0.06	2.4 $\pm$ 0.6	0.15 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.0
Day 8	Post	0.38 $\pm$ 0.10	2.3 $\pm$ 0.75	0.96 $\pm$ 0.54	0.22 $\pm$ 0.12
Día 10	Pre	0.25 $\pm$ 0.06	3.2 $\pm$ 0.73	0.48 $\pm$ 0.280.16	$\pm$ 0.04
Day 10	Post	0.25 $\pm$ 0.10	3.2 $\pm$ 0.580.70	$\pm$ 0.280.26	$\pm$ 0.10

a, b P= 0.06

c, d P= 0.08

humanos, de lo contrario, debería haberse observado un aumento en el cortisol plasmático al activarse el eje adrenal en respuesta al estrés (Recabarren, 1999). No obstante, la provisión de sustrato para la gluconeogénesis, proveniente del rumen, debió disminuir, lo cual significa que la borrega utilizó parte del tejido adiposo para mantener el aporte energético a los tejidos no insulino-dependientes. La lipólisis subsecuente se reflejó en la disminución del peso corporal. En humanos, el cortisol es una hormona de acción lipolítica y gluconeogénica, en especial, en estados de ayuno (Khani y Tajek, 2001). Durante el ayuno es posible que independiente del escaso cambio en los niveles plasmáticos de cortisol, se mejore la sensibilidad del tejido adiposo a la acción biológica del cortisol, y aun en concentraciones fisiológicas, éste actúe como una potente hormona lipolítica y gluconeogénica (Djurhuus y col., 2002).

La frecuencia de pulsos de LH no cambia, pero la amplitud de los pulsos tiende a disminuir con el ayuno. A su vez, la administración de bicuculina tuvo un efecto parcial sobre los

parámetros de secreción pulsátil de LH antes del ayuno pero no durante o después de él.

Se ha propuesto que el GABA regula la liberación pulsátil de LH en ovejas prepúberes y adultas, mediante la inhibición en forma significativa de la liberación de GnRH. Estudios en ovejas ovariectomizadas han demostrado que la acción gabaérgica se ejerce mediante receptores A (Scott y Clarke, 1993a), por lo que la administración de bicuculina, un antagonista de receptores A, podría entregar bases para reconocer si el GABA regula la secreción de LH durante períodos de ayuno, ya que la bicuculina bloquea aproximadamente en un 90% los efectos inhibitorios del GABA (Mayer, 1981). Los resultados del presente trabajo sugieren que la administración de bicuculina desinhibe parcialmente el efecto supresor del GABA sobre la secreción de LH antes del ayuno, pero que este efecto desaparece durante el ayuno, sin modificarse hasta 48 horas después de terminado el ayuno.

En monas Rhesus prepúberes (Keen y col., 1999, Mitsushima y col., 1994) y roedores (Akema y col., 1990), la administración de

bicuculina aumenta la secreción de LH. En ratas ovariectomizadas, la bicuculina inhibe la secreción de LH (Jarry y col., 1991). Sin embargo, la aplicación de bicuculina a ovejas adultas ha entregado resultados variables, y sus efectos se relacionan con el ambiente esterooidal presente. En ovejas ovariectomizadas, tratadas con altas dosis de estradiol durante el anestro estacional, la bicuculina inyectada intracerebro-ventricularmente en el área preóptica media, aumenta marcadamente la secreción de LH. Por el contrario, en ovejas, en las cuales el estrógeno baja parcialmente la LH, la bicuculina causa una notable disminución de LH (Scott y Clarke, 1993b). En otros trabajos se ha encontrado que la bicuculina es inefectiva tanto estimulando o inhibiendo la secreción de LH (Meyer y Goodman, 1986; Herbison y Dyer, 1991).

En la oveja el efecto de la bicuculina puede depender tanto del fotoperíodo y del grado de retroalimentación negativa ejercida por el estradiol sobre la secreción de LH (Ferreira y col., 1998). Este efecto puede ser una posible explicación para la diferencia del efecto de la bicuculina sobre la LH, entre el período de alimentación normal y el ayuno en las borregas del presente estudio. Es posible que las concentraciones de estradiol, de por sí bajas durante el desarrollo prepuberal, hayan disminuido durante el ayuno en las borregas del presente experimento, o bien que la distribución o número de receptores de estradiol en el hipotálamo también se hayan modificado producto del ayuno (Becket y col., 1997), fenómenos que habrían impedido la acción estimuladora de la bicuculina. Experimentos con borregas ovariectomizadas y ovariectomizadas con administración de estradiol en ayuno, podrían ayudar a descifrar el rol de las influencias del estradiol acerca del control gabaérgico sobre la secreción de LH durante el ayuno.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las vías gabaérgicas participarían en el control de la secreción de LH en ovejas prepúberes con alimentación normal. Durante el ayuno, el rol de las vías gabaérgicas no sería demostrable ya sea por una dosis deficiente del antagonista de receptores A o bien

por la activación de otras vías neuroendocrinas inhibitorias de la secreción de GnRH/LH (Kalra y Kalra, 1996). Las consecuencias metabólicas-endocrinas del ayuno se dirigen a influir en la relación glucosa-insulina para la conservación energética hacia los tejidos más que a la secreción de cortisol. Más aún, la conservación de los niveles plasmáticos de cortisol durante el ayuno sugiere que el ayuno no genera un estrés alimenticio.

## RESUMEN

El propósito de este estudio fue establecer si la actividad gabaérgica forma parte de los mecanismos supresores de la secreción pulsátil de LH durante el ayuno en ovejas prepúberes. 5 borregas Suffolk de 20 semanas de edad fueron sometidas a un ayuno de 8 días. Se recolectaron muestras de sangre mediante un cáteter endovenoso para medir en su plasma las concentraciones de LH, un día antes del comienzo del ayuno (día 0), el primer día de ayuno (día 1), el último día del ayuno (día 8) y 48 horas finalizado éste (día 10), cada 10 minutos, por cinco horas. Al término de las primeras 5 horas de muestreo se administró un pulso de bicuculina (50 ug/kg PV), un antagonista de receptores GABA-A, y se continuó el muestreo sanguíneo por otras cinco horas. Las características de la secreción pulsátil de LH se determinaron con el programa computacional Cluster. Se compararon las características de secreción de LH antes y después de la administración de bicuculina en los 4 días del ensayo empleando un test de t pareado para comparar entre períodos y Andeva para comparar entre días del ensayo.

El peso vivo y las concentraciones plasmáticas basales de glucosa disminuyeron con el ayuno, mientras que las concentraciones plasmáticas de insulina y cortisol se mantuvieron sin cambios. El peso vivo y la glucosa plasmática se recuperaron significativamente con la realimentación. La administración de un pulso de Bicuculina tendió a aumentar la concentración plasmática promedio y la amplitud de los pulsos ( $p < 0.07$ ) de LH, mientras que la frecuencia de pulsos y el nadir no cambiaron ( $p > 0.05$ ) antes del

ayuno (día 0). Por el contrario, la administración de bicuculina no tuvo efecto sobre estos parámetros de secreción de LH durante los días 1, 8 y 10 del ensayo ( $p > 0.05$ ).

Los resultados sugieren que las vías GABAérgicas participarían en el control de la secreción de LH en ovejas prepúberes con alimentación normal, situación que no es demostrable durante el ayuno. La ausencia de cambios en las concentraciones basales de cortisol sugieren que el ayuno no activa reacciones de stress.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la NIDDK- NIH de USA por su generoso aporte de LH standar ovina, al Dr. Gordon D. Niswender y Leo E. Reichert Jr. por el antisuero a LH ovina y LH ovina para iodación respectivamente para el RIA de LH.

## BIBLIOGRAFIA

- AKEMA, T., A. CHIBA, F. KIMURA. 1990. On the relationship between noradrenergic stimulatory and GABAergic inhibitory systems in the control of luteinizing hormone secretion in female rats. *Neuroendocrinology*. 52: 566-572.
- BECKETT, J. L., H. SAKURAI, B. M. ADAMS, T. E. ADAMS. 1997. Moderate and severe nutrient restriction has divergent effects on gonadotroph function in orchidectomized sheep. *Biol. Reprod.* 57: 415-419.
- DJURHUUS C. B., C. H. GRAVHOLT, S. NIELSEN, A. MENGEL, J. S. CHRISTIANSEN, O. E. SCHMITZ, N. MOLLER. 2002. Effects of cortisol on lipolysis and regional interstitial glycerol levels in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E172-E177
- FERREIRA, S. A., S. M. HILEMAN, D. E. KUEHL, G. L. JACKSON. 1998. Effects of dialyzing  $\gamma$ -amino butyric acid receptor antagonists into the medial preoptic and arcuate ventromedial region on luteinizing hormone release in male sheep. *Biol. Reprod.* 58:1038-1046.
- FOSTER, D. L., S. M. YELLOW, D. H. OLSTER. 1985. Internal and external determinants of the timing of puberty in the female. *J. Reprod. Fert.* 75:327-344.
- FOSTER, D. L., D. H. OLSTER. 1985. Effect of restricted nutrition on puberty in the lambs: Patterns of tonic luteinizing hormone (LH) secretion and competency of the LH surge system. *Endocrinology*. 116:375-381.
- HERBISON, A. E., R. G. DYER. 1991. Effects on luteinizing hormone secretion of GABA receptors modulation in the medial preoptic area at the time of proestrous luteinizing hormone surge. *Neuroendocrinol.* 53:317-320.
- I'ANSON, H., E. H. QUINT, R. I. WOOD, B. G. ENGLAND, D. L. FOSTER. 1994. Adrenal axis and hipogonadotropism in the growth-restricted female lamb. *Biol. Reprod.* 50:137-143.
- KALRA, S. P., P. S. KALRA, 1996. Nutritional infertility: The role of the interconnected hypothalamic neuropeptide Y-galanin-opioid network. *Front. Neuroendocrinol.* 17:371-401.
- JARRY, H., S. LEONHARDT, W. WUTTKE. 1991. Gamma-aminobutyric acid neurons in the preoptic/ anterior hypothalamic area synchronize the phasic activity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in ovariectomized rats. *Neuroendocrinol.* 53:261-267.
- KEEN K. L., A. J. BURICH, D. MITSUSHIMA, E. KASUYA, E. TERASAWA. 1999. Effects of pulsatile infusion of the GABA(A) receptor blocker bicuculline on the onset of puberty in female rhesus monkeys. *Endocrinology* 140:5257-5266.
- KHANI S., J. A. TAYEK. 2001. Cortisol increases gluconeogenesis in humans: its role in the metabolic syndrome. *Clin. Sci. (Lond)* 101:739-747.
- KILE, J. P., B. M. ALEXANDER, G. E. MOSS, D. M. HALLFORD, T. M. NETT. 1991. Gonadotropin-releasing hormone overrides the negative effect of reduced dietary energy on gonadotropin synthesis and secretion ewes. *Endocrinology*. 128:843-849.
- MAYER, M. L. 1981. Electrophysiological analysis of inhibitory synaptic mechanisms in the preoptic area of the rat. *J. Physiol.* 316:327-346.
- MEYER, S. L., R. L. GOODMAN. 1986. Separate neural systems mediate the steroid-dependent and steroid-independent suppression of tonic luteinizing hormone secretion in the anestrous ewe. *Biol. Reprod.* 35:562-571.
- MITSUSHIMA D, D. L. HEI, E. TERASAWA. 1994. gamma-Aminobutyric acid is an inhibitory neurotransmitter restricting the release of luteinizing hormone-releasing hormone before the onset of puberty. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91:395:399.

- MORLEY, J. E. 1987. Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocr. Rev.* 8:256-287.
- RECABARREN, S. E., P. ZAPATA, J. PARILO. 1990. Disappearance of opioidergic tone on LH secretion in underfed prepubertal sheep. *Horm. Metab. Res.* 22:225-228.
- RECABARREN, S. E., J. RAMÍREZ, L. MANRIQUEZ, P. ORELLANA, J. PARILO. 1992. Concentraciones plasmáticas de hormona luteinizante y hormona del crecimiento en borregos con restricción alimenticia. *Agro-Ciencia.* 7:155-160.
- RECABARREN, S. E., A. JOFRÉ, A. LOBOS, P. ORELLANA, J. PARILO. 1996. Effect of arginine and ornithine infusions on luteinizing hormone secretion in prepubertal ewes. *J. Anim. Sci.* 74: 162-166.
- RECABARREN, S. E. 1999. Stress nutricional y regulación neuroendocrina hipotalámica. *Agro-Ciencia.* 15: 221- 230
- RECABARREN, S. E., A. LOBOS, E. ABALOS, C. ARRIAGADA. 1999. Effect of naloxone infusions on the pulsatile LH secretion, insulin and cortisol plasma concentrations in fasted ewe lambs. *Exp. Clin. Endoc. Diabetes* 107 (suppl 1): S49. Abstract P-12.
- RECABARREN S. E, A. LOBOS, C. SCHNEIDER, J. COX, J. A. PARILO. 2000. Sensibilidad tisular a la insulina antes, durante y después de un ayuno en ovejas prepúberes. *Arch. Med. Vet.* 32: 139-146.
- SCOTT, C. J., I. J. CLARKE. 1993 a. Inhibition of luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes during the breeding season by  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA) is mediated by GABA-A receptors, but not GABA-B receptors. *Endocrinology.* 132:1789-1796.
- SCOTT, C. J., I. J. CLARKE. 1993b. Evidence that changes in the function of the subtypes of the receptors  $\gamma$ -amino butyric acid may be involved in the seasonal changes in the negative-feedback effects of estrogen on the gonadotropin-releasing hormone levels in the ewe. *Endocrinology.* 133:2904-2912.
- SCHILLO, K. K. 1992. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 70:1271-1282.
- VELDHUIS, J. D., M. L. JOHNSON. 1986. Cluster analysis: a simple, versatile, and robust algorithm for endocrine pulse detection. *Am. J. Physiol.* 250: E468-E493.
- WADE, G. N., J. E. SCHNEIDER, H-Y LI. 1996. Control of fertility by metabolic cues. *Am. J. Physiol.* 270:E1-E19.

