

EFECTO DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE *Trypanosoma vivax* SOBRE LA PRODUCCIÓN DE TESTOSTERONA COMO RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN CON GnRH, EN TOROS MESTIZOS.

NOTA TÉCNICA

The Effect of Experimental Infection of *Trypanosoma vivax* upon Production of Testosterone as a Response to Administration with GnRH, in Crossbred Bulls. Technical Note

Hilda De Stefano¹, Bernardo González-Baradat¹, Héctor Soto¹ y Susmira Godoy²

¹Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez, Apartado 47925. Caracas 1041-A, Venezuela. Telfs: 02- 6817455 Telefax: 682-1521. E-mail: hdestefa@unesr.edu.ve.

²Departamento de Zootecnia, Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay, Edo. Aragua, Venezuela.

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron los cambios de la concentración de testosterona en suero sanguíneo en respuesta a la estimulación con GnRH en toros mestizos (5/8 *Bos taurus* 3/8 *Bos indicus*), infectados experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. La determinación de testosterona fue llevada a cabo mediante el ensayo inmunofluorométrico estandarizado (DEL-FIA). Tres (3) toros (cuyas edades oscilaban entre 24 y 30 meses) fueron evaluados clínica y parasitológicamente, además se realizó el seguimiento de la calidad espermática durante el proceso de experimentación. La determinación de la concentración de testosterona durante el período de post-infección se realizó en la fase crónica de la enfermedad (65 días posterior a la inoculación). Los resultados indican que los animales infectados responden más lentamente al estímulo con GnRH, y la concentración de testosterona producida es menor. Este resultado es consistente con la hipótesis que la tripanosomiasis puede interferir en la modulación del eje hipotálamo-hipófisis-gonada, afectando la esteroidogénesis testicular.

Palabras clave: GnRH, testosterona, tripanosomiasis, ensayo inmunofluorométrico.

ABSTRACT

Present work deals with the evaluation of changes in testosterone concentration as a response to treatment with GnRH in

crossbred bulls (5/8 *Bos taurus* 3/8 *Bos indicus*) infected experimentally with *Trypanosoma vivax*. The determination of testosterone was carried out by means of standardized immunofluorometric assay (DEL-FIA). Three bulls (whose ages range between 24 and 30 months old) were evaluated clinical and parasitologically, also for spermatid quality during experimental period. Determination of concentration of testosterone postinoculation, was carried out during chronic phase of the illness (65 after inoculation). Results indicate that infected animals have a slower response to the stimulus with GnRH, also they have a smaller concentration of testosterone. These results are consistent with the hypothesis that trypanosomiasis may interfere in the modulation of the hypothalamic-hypophysis-gonadal axis by tripanosomiasis affecting testicular steroidogenesis.

Key words: GnRH, testosterone, tripanosomiasis, fluorimunoassay.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis bovina es causada por el *Trypanosoma vivax* y es considerada entre las enfermedades más importantes responsable de ciertos desórdenes del sistema reproductor, tanto en machos como en hembras [2, 7, 8, 15, 16]. Específicamente, existen reportes en los que machos infectados con *Trypanosoma* spp., han demostrado alteraciones del comportamiento sexual y de la calidad espermática [13, 14, 15]. El mecanismo mediante el cual la enfermedad afecta la función sexual de los individuos, no está claramente definido, considerándose como una posibilidad la interrupción de la co-

municación a nivel del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada [4]. Como es bien conocido, el sistema reproductor está bajo control neuroendocrino. El hipotálamo produce los factores liberadores de gonadotropinas (GnRH) que estimulan la porción anterior de la hipófisis (adenohipófisis), para producir las gonadotropinas (FSH, LH/ICSH, prolactina, y luteotropina). En el caso de individuos masculinos, la LH/ICSH (Hormona Estimulante de las Células Intersticiales) actúa sobre los testículos, estimulando la producción de testosterona por parte de las Células de Leydig y modula la espermatogénesis, entre otras funciones [5]. Enfermedades como las tripanosomiasis, pueden causar lesiones en el hipotálamo, adenohipófisis y gónadas, interrumpiendo el control neuro-endocrino de la reproducción, el cual puede resultar en una amplia variedad de desórdenes reproductivos [16], específicamente, se puede resaltar el reporte realizado por Mutayoba [12], en el cual se hace referencia a la presencia de *T. vivax* en la hipófisis de bovinos infectados. Aunque una cantidad considerable de investigaciones han sido enfocadas hacia el estudio de la tripanosomiasis, son escasos los estudios dirigidos a la disfunción reproductiva inducida por la enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la infección con *T. vivax* sobre la producción de testosterona inducida por la estimulación con GnRH, en toros mestizos (5/8 *Bos taurus*, 3/8 *Bos indicus*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localidad

El trabajo experimental fue realizado en las instalaciones del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP), ubicado a 452 m.s.n.m. en la ciudad de Maracay, Estado Aragua, Venezuela. Dicha región se caracteriza por presentar una humedad relativa de 70% y precipitación promedio de 700mm. La experimentación se realizó durante el período de sequía con una temperatura promedio de 30°C y un fotoperíodo de doce horas luz/día.

Animales

Tres (3) toros de edad comprendida entre 24 a 30 meses, en excelentes condiciones de salud, se eligieron al azar a partir de un grupo de 16, a los que se les había efectuado un seguimiento de la condición física, clínica y parasitológica así como de la calidad espermática, durante el año previo al experimento. Los mismos se alimentaban diariamente con una mezcla de pastos picados (*Panicum maximum* + *Pennisetum purpureum*, cuyo perfil bromatológico fue el siguiente: PC: 9,40%, FC: 30,65%, EE: 2,26%, P: 0,29%, Ca: 0,56% y agua *ad libitum*).

Infección experimental

Los tres animales seleccionados se inocularon con 1 mL de sangre de ovejo infectado con *T. vivax* (aislado "Tucacas" donado por el Laboratorio de Parasitología, Facultad de Cien-

cias Veterinaria, Universidad Central de Venezuela). La concentración de parásitos inoculada fue de 10^6 trip/mL, cuantificada con la cámara de Neubauer. Posterior a la inoculación los animales se colocaron en vaqueras aisladas para evitar la transmisión de la infección.

Evaluación física, clínica y parasitológica

Los parámetros monitoreados durante toda la fase experimental fueron peso corporal, circunferencia escrotal, temperatura corporal, hematocrito y parasitemia, ésta última mediante la técnica de Woo [18].

Evaluación de la calidad de semen

Las muestras fueron analizadas sobre la base de los siguientes parámetros: motilidad individual, atipias presentes, concentración espermática según los procedimientos propuestos por Lunstra [9] y viabilidad (mediante la tinción con azul de tripano).

Evaluación hormonal

La determinación hormonal se realizó en dos fases, la primera fue dos semanas previas a la infección y la segunda sesenta y seis días posterior a la misma (fase crónica de la enfermedad). Para su determinación, se procedió a inyectar a los toros con Fertagyl® (solución acuosa que contiene hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH) cuya dosis individual fue 500 µg del principio activo. Las muestras de sangre fueron colectadas a intervalos de 20 min. durante una hora y posteriormente a intervalos de cuarenta minutos hasta completar cuatro horas, para un total de ocho muestras posteriores al reto con GnRH. Las muestras sanguíneas fueron procesadas obteniéndose los sueros respectivos, procediendo a congelarlos inmediatamente y almacenarlos a una temperatura aproximada de -10°C, durante una semana.

La determinación de la concentración de testosterona fue realizada mediante un ensayo estandarizado Inmunofluorométrico, empleando un equipo para diagnóstico *in vitro* Delfia® de Wallace Oy, N° A050-101. Este método es considerado como una excelente alternativa ya que se ha reportado que el mismo presenta una mayor sensibilidad y precisión al comparar con el radio-inmunoensayo y el inmunoensayo enzimático, utilizando suero de bovinos [6].

La metodología está basada en la competencia entre testosterona marcada con europio y la testosterona proveniente de la muestra problema, por un anticuerpo anti-testosterona. El lector detecta el europio libre, que fluoresce al formar micelas con agentes quelantes, fluorescencia que es inversamente proporcional a la concentración de testosterona presente en las muestras.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para comparar dos muestras relacionadas, con el programa estadístico GraphPad InStat v2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clínicos

Los animales infectados presentaron parásitos en sangre periférica a partir del séptimo día determinada por la técnica parasitológica utilizada [18]. La parasitemia fue recurrente durante el período de muestreo. Además, presentaron síntomas de anorexia, aletargamiento, pérdida de equilibrio y debilidad. El individuo control se mantuvo su condición de salud. Al cabo de diez días, la temperatura corporal incrementó en los animales infectados, regresando a valores normales posteriormente. Según estos datos se evidencia que el período de incubación de los parásitos para éste caso fue de siete días. Los valores del volumen del paquete celular variaron desde un 28% hasta 17% el cual se recuperó (29%) posterior a las diez y seis semanas de haber sido tratados, indicando estos datos que los mismos desarrollaron la sintomatología de la enfermedad [10].

Calidad de semen

Los animales utilizados en el experimento presentaban buenas características en lo que se refiere a la calidad del semen en el año previo al experimento, evaluados según el procedimiento propuesto por Lunstra y colaboradores [9]. Con respecto a la viabilidad y la motilidad individual se observó que ambos valores disminuyeron significativamente en los animales infectados (viabilidad desde 80% hasta menos de 20%, y motilidad desde 75% hasta menos de 10%). Analizando el porcentaje de atipias general se encontró que las mismas aumentaron con la infección (desde 15% hasta cerca de 50%) luego, al final del experimento, mostró valores parecidos al control. La circunferencia escrotal no indicó cambios significativos. Estos resultados, demuestran que el mencionado hemoparásito

tiene un efecto negativo sobre la calidad espermática, el cual puede ser atribuido a perturbaciones fisiológicas y/o endocrínicas.

Concentración hormonal

Los cambios obtenidos con respecto a la concentración de testosterona después de la inyección con GnRH se muestran en la FIG. 1. La concentración de testosterona permanece basal para los animales preinfectados y postinfectados durante la primera toma de muestra (tiempo = 0 min), posteriormente (40 min) incrementa para ambos grupos observándose una mayor producción de testosterona para los animales en fase de preinfección en comparación con la fase de postinfección ($P < 0,0001$), permaneciendo éste último, relativamente constante durante cuatro horas.

Los cambios en la concentración de testosterona observados cuando los animales se encontraban sanos confirma la eficacia del producto utilizado para generar la estimulación que se traduce en la producción de la hormona, además se encontró que dicha estimulación disminuye cuando los animales se encuentran en fase de infección (crónica), por lo que los resultados sugieren que la enfermedad ya sea directa o indirectamente está involucrado en los cambios esteroidogénicos observados, es decir, los testículos de los toros infectados presentaron una menor capacidad de producir testosterona. Resultados semejantes han sido reportados por Boly y col. [3, 4]. Esta baja producción de testosterona después del reto con GnRH permite inferir que los cambios reflejados pueden ser ocasionados por diversas causas como lo son: 1) Deterioro sobre la adenohipófisis con incapacidad de liberar ICSH, 2) Aunque se produzca la hormona, ésta presente un cambio en su conformación lo que impediría su reconocimiento por parte de las células de Leydig, 3) que la tripanosomiasis promueve

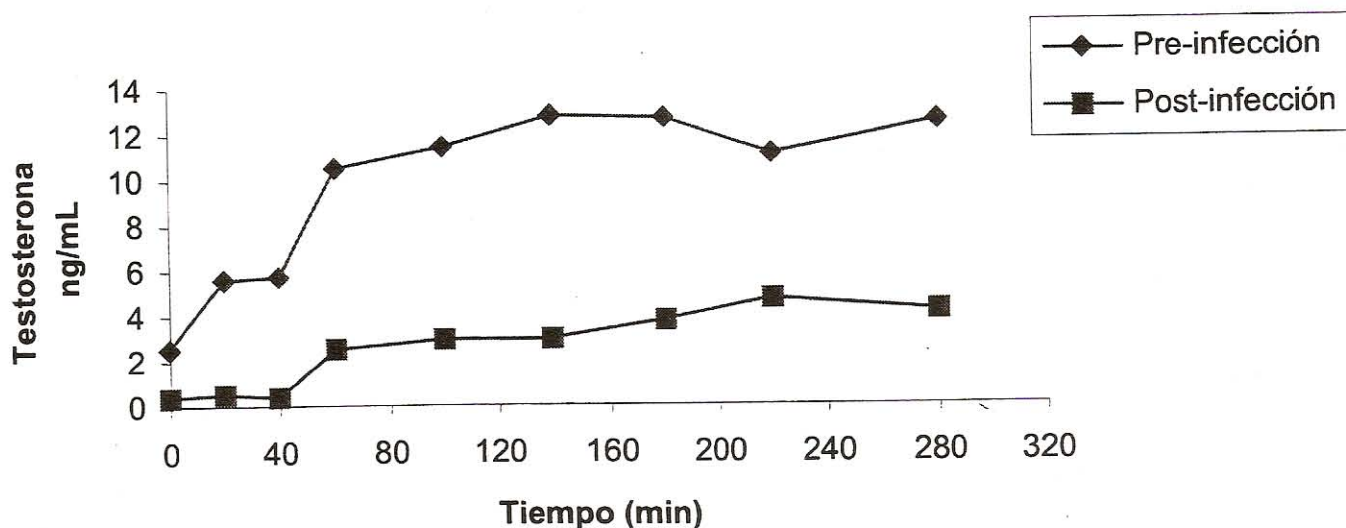


FIGURA 1. VALORES PROMEDIO DE TESTOSTERONA SÉRICA OBTENIDOS POSTERIORMENTE A LA ESTIMULACIÓN CON GnRH, PREVIO Y POSTERIOR A LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Trypanosoma vivax*. $P < 0,0001$.

cambios sobre la producción de hormonas adrenales que interfieren en la esteroidogénesis [12] ó, 4) el daño es directo sobre las gónadas, específicamente las células de Leydig, traduciéndose en la imposibilidad de los testículos a ser estimulados para la producción de testosterona. Este último punto ha sido reportado por Soudan y colaboradores [17], quienes encontraron una reducción de receptores de ICSH en las células de Leydig de ratón, debido a la infección con *Trypanosoma*.

Debido a que en el presente trabajo únicamente se midió el efecto mediante la variación de la concentración de hormonas, no es posible precisar el nivel o niveles que ocurre la interrupción de la comunicación del eje reproductor, por lo que se hace necesario realizar estudios complementarios al actual determinando otras hormonas como por ejemplo la LH, lo que permitiría discriminar con mayor precisión el nivel al cual pueden ocurrir los cambios que generan la disfunción del sistema reproductor.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La infección experimental con *T. vivax* fue capaz de alterar la actividad reproductiva de toros mestizos (5/8 *Bos taurus*, 3/8 *Bos indicus*) medida en términos de calidad de semen.

Aunque no se determina a que nivel del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada está afectando la infección con *Trypanosoma vivax*, los resultados aquí señalados indican que la capacidad de producir testosterona (ya sea por efecto directo o indirecto) por parte de las células de Leydig disminuye considerablemente.

Se recomienda aumentar el número de animales y profundizar estudios en el área ya sea mediante determinaciones hormonales o histoquímicas (a nivel del hipotálamo e hipófisis), a fin de discernir a que nivel se pueden estar dando los cambios y los posibles factores que puedan estar involucrados.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo se realizó gracias al personal del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV; el personal Técnico del Departamento de Biología Experimental del Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios de la Universidad Simón Rodríguez y; el presupuesto ordinario de investigación del Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios de la Universidad Simón Rodríguez, y a el proyecto de fortalecimiento de centros F-96001279 otorgado por CONICIT.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANOSA, V. Haematological and biochemical changes in human and animal trypanosomiasis. Part I. **Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.** Vol. 41(1): 65-78. 1988
- [2] AGU, E.; IGE, K.; OLATUNDE, D. Evaluation of semen quality of rams infected with *Trypanosoma vivax*. **Anim. Rep. Sci.** 11: 123-127. 1986
- [3] BOLY, H.; THOMBIANO, D.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M. Influence de *Trypanosoma congolense* sur la fonction sexuelle de taurins Baoulé. **Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.** 44 (4): 475-480. 1991.
- [4] BOLY, H.; HUMBLLOT, H.; TILLET, Y.; THIBIER, M. Effects of *Trypanosoma congolense* infection on the pituitary gland of Baoulé Bulls: immunohistochemistry of LH-FSH-secreting cells and response of plasma LH and testosterone to combined dexametasona and GnRH treatment. **J. Rep. Fert.** 100: 157-162. 1994.
- [5] DANIEL, R. Regulation of FSH Synthesis and Secretion. In: Thibault, C.; Levasseur, M.C. and Hunter, R.H. (Ed.), *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses, París. 97-120. 1993.
- [6] ELLIOTT, C.T.; FRANCIS, K.S.; SHORTT, H.D.; MCCAUGHEY, W.J. Determination of the concentrations of the Steroids Estradiol, Progesterone and testosterone in Bovine sera: Comparison of Commercial Dissociation Enhanced lanthanide Fluorescence Immunoassay Kits with conventional Radio and Enzyme Immunoassays. **Analyst.** 120: 1827-1830. 1995.
- [7] GONZÁLEZ, N.; ESPINOZA, E.; RANGEL, L. Efecto del *Trypanosoma vivax* sobre la gestación de vacas mestizas Holstein-Cebú inoculadas experimentalmente. **Vet. Trop.** 21: 111-127. 1996
- [8] GONZÁLEZ, N.; ESPINOZA, E. Relación entre la infección con *Trypanosoma vivax* y la eficiencia reproductiva en hembras bovinas a pastoreo con suplementación estratégica. **Vet. Trop.** 22: 91-100. 1997.
- [9] LUNSTRA, D.; FORD, J.; ECHTERNKAMP, S. Puberty in Beef Bulls: Hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in Bull of different breeds. **J. Anim. Sci.** 46, (4): 1054-1062. 1978.
- [10] MAXIE, M.; LOSOS, G.; TABEL, H. Experimental bovine trypanosomiasis (*Trypanosoma vivax* y *T. congolense*). **1st Symptomatology and clinical pathology. Trpenned. Parasitol.** 30: 274-282. 1979.
- [11] MUTAYOBA, B.M.; ECKERSALL, P.D.; JEFFCOATE, I.A.; CESTNIK, V.; HOLMES, P.H. Effects of *Trypanosoma congolense* infection in rams on the pulsatile secretion of LH and testosterone and responses to injection of GnRH. **J. Rep. Fertil.** 102:425-431. 1994.
- [12] MUTAYOBA, B.M.; ECKERSALL, P.D.; SEELY, C. Effects of *Trypanosoma congolense* on pituitary and adrenocortical function in sheep: responses to exogenous corticotrophin-releasing hormone. **Res. Vet. Sci.** 58: 180-185. 1995.

- [13] SEKONI, V. Effect of novidium (homidium chloride) chemotherapy on genital lesions induced by *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infection in zebu bulls. **Br. Veter. J.** 146 (2): 181-185. 1990.
- [14] SEKONI, V. The Effect of *Trypanosoma vivax* and *T. congolense* on the reaction time and semen characteristics in the Zebu Bull., **Br. Vet. J.** 148: 501-506. 1992.
- [15] SEKONI, V. Elevated sperm morphological abnormalities of Yankasa rams consequent to *T. vivax* infection. **Anim. Rep. Sci.** Vol. 31(3,4): 243-248. 1993.
- [16] SEKONI, V. Reproductive disorders caused by animal trypanosomiasis: a review. **Theriogenology.** Vol. 42: 557-570. 1994.
- [17] SOUDAN, B.; TETAERT, D.; RACADOT, A.; DEGAN, P.; BOERSMA, A. Decrease of testosterone level during an experimental African trypanosomiasis: involvement of testicular LH receptor de desensitization. **Acta Endocrinol.** 127: 86-92. 1992.
- [18] WOO, P. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. **Can. J. Zool.** Vol. 47: 921-923. 1969.