

Introducción

- La gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG), se extrae de suero o plasma de yeguas preñadas y por su efecto LH y FSH es frecuentemente utilizada en protocolos de inseminación artificial en animales de producción.
- La Farmacopea Europea (EP 7.0), establece que la potencia de la hormona se determina inyectando grupos de ratas de 21 a 23 días de edad, en una serie de 6 inyecciones y el posterior sacrificio de las mismas a las 72 horas para pesar su masa ovárica.
- Con el objetivo de refinar nuestros ensayos (3Rs de Russel y Burch), estudiamos si la metodología de Cole & Erway (1941), nos brinda resultados válidos con un menor impacto sobre el bienestar de los animales.

Materiales y métodos.

- Hormona: Solución estándar de PMSG (1000 UI/ml). La misma fue diluida con suero fisiológico.
- Animales: Ratas Wistar (URBE, Facultad de Medicina, Uruguay), hembras, de 21 a 23 días de vida con una diferencia de peso entre ellas de no más de 10 gr.
- Ensayo in vivo: _

Método EP7.0

Se inyectó a 3 grupos de ratas (n=5), 6 inyecciones subcutáneas de 4, 8 o 12 UI en diluidos 0,3 ml. Cada grupo recibió su inyección a las 18h, 21h, 24h, 42h y 48h de la primera inyección, recibiendo cada grupo un total de 24, 48 y 72 UI de eCG respectivamente (Figura 1 A).

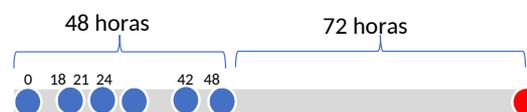
Método Cole & Erway (1941)

Se inyectó a 3 grupos de ratas (n=5), una única inyección subcutánea de 10, 20 o 40 UI diluidas 0,3 ml (Figura 1B).

En ambas metodologías se sacrificaron los animales por dislocación cervical a las 72h de la última inyección, se diseccionaron los dos ovarios de cada rata; y se registró el peso en balanza analítica. Los resultados se analizaron mediante el software de análisis bioestadístico (PLA 3.0).

Los bioensayos no se realizaron simultáneamente, en este trabajo se comparan los resultados del estándar de 10 ensayos con cada metodología, bajo el protocolo CEUA Medicina Exp. 070153-000610- 15.

A) Farmacopea Europea



B) Cole & Erway (1941)

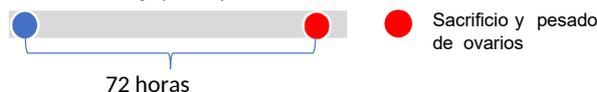


Figura 1. Esquema de dosificaciones de eCG según diferentes protocolos

	Cole & Erway	EP7.0
Cantidad de ratas	15	15
Inyecciones/rata	1	6
Volumen inyectado	0,3 ml	1,8 ml/rata
Duración ensayo	72 horas	120 horas

Tabla 1. Cuadro comparativo de manejo de las ratas entre los ensayos

Resultados

Ambas metodologías permiten emitir resultados estadísticamente válidos de potencia de soluciones de eCG analizados por software de análisis bioestadístico (PLA 3.0).

- Las pendientes de las curvas dosis respuesta no difieren estadísticamente con las dos metodologías utilizadas (p=0.90), (Figura 2).
- La aplicación de una sola dosis, reduce la manipulación, el volumen de la solución administrada, el número de inoculaciones y el dolor infligido por el procedimiento a los animales (Tabla 1).

Conclusiones

- La metodología propuesta por Cole & Erway introduce mejoras en el sistema de evaluación sugerido por la FARMACOPEA EUROPEA estando más alineado a los principios de las 3R (Reemplazar, Reducir, Refinar) de Russel y Burch.

Bibliografía:

- Cambarnous Y, Mariot J, Relav L, Nguyen TMD, Klett D. Choice of protocolo for the in vivo bioassay of equine Chorionic Gonadotropin (eCG/PMSG) in immature rats. Theriogenology 130 (2019) 99-102.
- Cole H., Erway j. 48-hour assay test for equine gonadotropin with results expressed in international units. Endocrinology (1941) 29:514-9
- European Pharmacopoeia 7.0. 01/2008:0719

Estudio de las pendientes de las dos metodologías

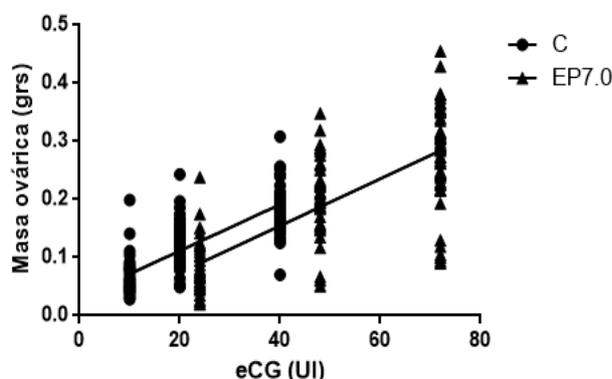


Figura 2. Estudio de la pendiente del estándar de eCG administrado en diferentes metodologías. C. Cole & Erway EP7.0. Farmacopea Europea.