

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

TESIS DOCTORAL

MV. MARIELA EUGENIA GRISOLIA ROMERO

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

EFECTO DE UN DISRUPTOR POSTNATAL ESTEROIDE Y UNO NO-ESTEROIDE EN LA REPRODUCCIÓN DE FELINOS DOMÉSTICOS *(FELIS CATUS)*

AUTOR: Med. Vet. GRISOLIA ROMERO, Mariela E. DIRECTOR: Dra. GOBELLO, Cristina, DECAR CO-DIRECTOR: Dra. FAYA, Marcela I.

LUGAR DE TRABAJO: Centro de Fisiología Reproductiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP

MIEMBROS DEL JURADO: Dr. Cerdá, Ricardo Dra. Furnus, Cecilia Dr. Gimeno, Eduardo

Año 2022

A todos los animales que participaron en esta tesis. A mis abuelos, mis ángeles en el cielo. Y a todos los que, de alguna manera, me acompañaron en esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

- A mi directora, la Doctora Cristina Gobello, por haberme acompañado y guiado en el camino de la investigación. Por su paciencia y dedicación.
- A mi codirectora, la Doctora Marcela Faya, por haberme dado la posibilidad de conocer y trabajar en esta hermosa tarea diaria.
- A mis padres y mis hermanos, por su afecto y por esforzarse siempre en mi educación. Especialmente a mi mamá, por su amor y ayuda incondicional.
- A mi compañero de vida, Raúl Bustos, por sus valiosos consejos y su apoyo constante.
- A Cynthia Marchetti, por hacer que cada día sea ameno. A Marcelo Priotto, por su colaboración en mis proyectos. Y a ambos por su alegría.
- A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, por abrirme las puertas y brindarme una formación académica gratuita de excelencia.
- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), por otorgarme la beca doctoral, y por proporcionar a través del PICT 2014-0426 parte de la financiación de esta Tesis.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca de finalización de doctorado y así poder dedicarme exclusivamente a los estudios de Doctorado.
- Al Contraception & Reproductive Health Branch Center for Population Research, NIH, USA, quien proporcionó el acyline.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

Publicaciones en revistas científicas internacionales

- Grisolia M, Faya M, Marchetti C, Merlo ML, D'Francisco F, Bellini M J, Gobello C. Physical, histological, endocrinological and steroidogenical evaluation of male cats postnatally exposed to sexual steroids. Theriogenology 138 (2019) 47-51.
- Grisolia-Romero M, Faya M, Marchetti C, Körber H, Goericke-Pesch S, Gobello C. Testicular effects of a postnatal GnRH antagonist in domestic cats. Acta Veterinaria Hungarica 70 (2021) 44-50.

Publicaciones a congresos nacionales e internacionales

Grisolia Romero M, Faya M, Marchetti C, López Merlo, M, D'Francisco F, Priotto M, Zurbriggen G, García P, Gobello C. Evaluación física, histológica, endocrina y esteroidogénica de la administración postnatal de esteroides sexuales en gatos machos. IX Jornadas de Jóvenes Investigadores, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, 2019, Capital Federal, Argentina.

- Grisolia Romero M, Faya M, Marchetti C, Bellini MJ, Blanco PG, López Merlo M, Gobello C. Physical, histological, endocrinological and steroidogenical evaluation of male cats postnatally exposed to sexual steroids. 22nd International Congress of the European Veterinary Society For Small Animal Reproduction (EVSSAR), 2019, Berlin, Alemania.
- Grisolia-Romero M, Faya M, Marchetti C, Gobello C. Disrupción neonatal temprana del eje gonadal en el felino doméstico hembra. VIII Jornada de Difusión de la Investigación y Extensión, 2020, Santa Fe, Argentina.
- Grisolia-Romero M, Faya M, Marchetti C, Gobello C. Efecto testicular de un antagonista de GnRH postnatal en felinos machos. Encuentro de Becaries de posgrado de la Universidad Nacional de La Plata, 2020, La Plata, Argentina.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS
INTRODUCCIÓN GENERAL
6 CAPÍTULO I Efecto del antagonista de GnRH, acyline, en felinos machos y hembras
postnatales 17 CAPÍTULO II
<i>Efecto del esteroide, enantato de testosterona en felinos machos postnatales</i>
CONCLUSIONES FINALES
PUBLICACIONES
•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••

ABREVIATURAS

ACY: acyline
PL: placebo
ET: enantato de testosterona
GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas
LH: hormona luteinizante
E2: 17β-estradiol
T: testosterona
P4: progesterona
vs: versus
cm: centímetro
ml: milímetro
g: gramo
ng: nanogramo
μ m : micrómetro
μm ² : micrómetro cuadrado
H&E: hematoxilina y eosina
P450scc: citocromo P450
P450c17: 17α-hidroxilasa
SEM: error estándar de la media
ANOVA: análisis de la varianza

EFECTO DE UN DISRUPTOR POSTNATAL ESTEROIDE Y UNO NO-ESTEROIDE EN LA REPRODUCCIÓN DE FELINOS DOMÉSTICOS *(FELIS CATUS)*

Palabras clave: felino doméstico, contracepción, antagonista GnRH, andrógeno

Resumen

La sobrepoblación de gatos domésticos es una problemática no resuelta que conlleva a dificultades sociales, sanitarias y medioambientales. En esta Tesis se describió el efecto del antagonista de GnRH, acyline (ACY) y del esteroide, enantato de testosterona (ET) en gatos postnatos con fines contraceptivos. Se trabajó con veintitrés felinos mestizos postnatos, que se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos: i) ACY 2,2mg/100g sc (n=11) o placebo (PL; n=8) y ii) ET 18mg sc (n=4) o placebo (n=4) en machos. Se realizó un seguimiento físico, citológico y hormonal en materia fecal hasta la pubertad, cuando se realizaron pruebas de fertilidad y se castraron para estudiar histológicamente sus gónadas. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente. Los tratamientos no afectaron la edad, peso corporal, libido, ni fertilidad a la pubertad, ni provocaron efectos colaterales, excepto un gato ACY con criptorquidismo inguinal unilateral. En las primeras 5 semanas postnatales los machos ACY y ET presentaron concentraciones fecales de testosterona

disminuidas y aumentadas (P<0,05), respectivamente. Las gatas y los gatos ACY mostraron el número de folículos antrales, y la altura del epitelio seminal disminuidos (P<0,05). En los gatos ET, se observó un incremento de la luz tubular y detritos luminares con disminución del área nuclear de las células de Leydig (P<0,05). Se concluye que el tratamiento postnatal con ACY y ET, no modificó la edad, peso ni fertilidad a la pubertad, pero en machos, alteraron la testosterona fecal postnatal. Ambos tratamientos provocaron cierto grado de deterioro histológico gonadal. El efecto reproductivo a largo plazo de estos hallazgos merece ser estudiado en el futuro.

EFFECT OF A STEROID AND A NON-STEROID POSTNATAL DISRUPTOR ON THE REPRODUCTION OF DOMESTIC CATS (*FELIS CATUS*)

Keywords: domestic felid, contraception, GnRH antagonist, androgen

Summary

Domestic cats overpopulation is an unsolved problem that leads to social, health and environmental difficulties. This Thesis describes the effect of the GnRH antagonist, acyline (ACY) and the steroid, testosterone enanthate (ET) in postnatal cats for contraceptive purposes. Twenty-three postnatal crossbreed cats, were randomly assigned to one of the following treatments: i) ACY 2.2 mg/100g sc (n=11) or placebo (PL; n=8) and ii) ET 18 mg sc (n=4) or placebo (n=4) in males. A physical, cytological, and hormones in feces follow-up was carried out until puberty when fertility tests were carried out. Then the animals were gonadectomized to histologically study their gonads. The data obtained were statistically analyzed. None of the treatments affected age, body weight, libido, or fertility at puberty, nor did they present side effects, except for one ACY cat with unilateral inguinal cryptorchidism. In the first postnatal weeks, ACY and ET males showed decreased and increased fecal testosterone concentrations (P<0.05), respectively. Female and male ACY cats showed a decreased number of antral follicles and in the height of the seminal epithelium (P<0.05). The ET male cats

presented an increase of testicular tubular lumen and debris, and a decreased Leydig cell nuclear area (P<0.05). It was concluded that ACY and ET postnatal treatments did not modify age, body weight, nor fertility at puberty, but they altered postnatal fecal testosterone in male cats. Both treatments caused a mild degree of gonadal histological deterioration. The long-term reproductive effect of these findings warrants further studies.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El gato doméstico (*Felis catus*) tiene un lugar cada vez más importante como mascota, convirtiéndose en un apoyo para mejorar la salud y el bienestar físico y emocional de los seres humanos (Vincent y col., 2020). Además, este felino es un importante modelo experimental tanto para enfermedades humanas (Wildt y col., 1986; Neuzeret y col., 2010) así como también para la búsqueda de nuevas biotecnologías en la conservación de felinos silvestres en peligro de extinción (Pope, 2000; Farstad, 2000). Como contraparte los gatos mestizos sin dueño han incrementado su población y debido a su eficiencia reproductiva esto se ha convertido en un grave problema a nivel mundial, ocasionando depredación, disturbios públicos, y transmisión de zoonosis, entre otras consecuencias adversas (Robertson, 2008).

La hembra felina fue tradicionalmente clasificada, de acuerdo a su ciclo estral, como poliéstrica estacional de fotoperiodo positivo, cesando su actividad ovárica bajo fotoperiodos decrecientes (Foster y Hisaw, 1935). Sin embargo, a latitudes ecuatoriales (da Silva y col., 2006) y templadas (Scott y col., 2002; Nutter y col., 2004; Faya y col., 2011) las gatas presentan ciclos estrales durante todo el año. La hembra felina alcanza generalmente la pubertad entre los 5 y 9 meses de edad, aunque se describió un rango de 3,5 a 18 meses y más de 2 kg de peso corporal (Griffin, 2001a). Si bien el inicio de la pubertad está influenciado por factores como raza, fotoperiodo, ambiente social, salud, condición física y

nutricional (Feldman y Nelson, 2004) se reportó que las gatas de vida libre comienzan a ciclar antes que las gatas con dueño (Schmidt, 1986).

En esta especie la ovulación es mayormente inducida, requiriendo la cópula o estimulación mecánica del cérvix para liberación de la hormona luteinizante (LH) y consecuente ovulación (Paape y col., 1975). También fue reportada ovulación espontánea en ausencia de apareamiento en un 25-30% de los casos (Greulich, 1934).

El ciclo reproductivo de la gata incluye proestro, estro, interestro, diestro y anestro (Little, 2012). El proestro es el periodo en el cual las hembras atraen a los machos, aunque no se encuentran sexualmente receptivas, presentando agresión ante la proximidad de éstos. En ésta etapa que puede extenderse desde 12 horas a 3 días (Feldman y Nelson, 2004), ocurre un rápido crecimiento folicular ovárico y aumento de la síntesis de 17β-estradiol (E2; Griffin, 2001a). La sintomatología en este periodo suele ser sutil (Johnston, 2001). El estro es la etapa de receptividad sexual, con una duración promedio de 4 a 7 días. Si bien en esta etapa la concentración de E2 aumenta abruptamente, los labios vulvares no evidencian cambios observables y la secreción vulvar raramente se detecta. Las hembras, en este periodo, presentan vocalizaciones, frotan cabeza contra objetos, presentan postura de lordosis, con tórax ventral y abdomen en contacto con el suelo, periné elevado y lateralización de la cola (Griffin, 2001a). El interestro se manifiesta en los casos que no ocurre la ovulación, y se define como el intervalo de inactividad sexual entre ondas foliculares, con una duración promedio de 1 a 3 semanas. Durante esta etapa el E2 sérico retoma concentraciones basales (Feldman y Nelson, 2004). El diestro ocurre en el caso que la ovulación haya ocurrido y se

caracteriza por la formación de cuerpo lúteo dentro de las 24 a 48hs de ésta, con predominio hormonal de la progesterona durante unos 30 a 45 días (Griffin, 2001a). Si ocurre la ovulación con fertilización comienza una gestación, y esta etapa progestacional tendrá una duración de 65 a 67 días (Jemmett y Evans, 1977). El anestro es la ausencia de actividad cíclica y durante esta etapa, la progesterona (P4) y los E2 se encuentran en concentraciones basales y la hembra no es receptiva (Johnston, 2001).

Por su lado, el gato macho alcanza la pubertad entre los 8 y 10 meses de edad (Kustritz, 2014) con más de 3 kg de peso corporal (Goodrowe y col., 1989). La espermatogénesis se aprecia alrededor de las 20 semanas, y los primeros espermatozoides aparecen en el cordón espermático a las 30-36 semanas de vida (Verstegen, 2000). En el gato, como en la mayoría de los mamíferos, los testículos descienden desde la cavidad abdominal a través del anillo inguinal dentro del escroto previo al nacimiento. Así mismo antes de alcanzar la pubertad éstos se pueden encontrar móviles en el canal inguinal (Scott y Scott, 1957; Sojka, 1980). Las espículas peneanas son sensibles a los andrógenos y conocidas como indicadores externos del nivel de testosterona (T) sérica (Johnston, 2001).

Al nacimiento, los mamíferos experimentan una deprivación abrupta de las hormonas maternales seguido de una estimulación del eje hipotálamo-hipófisogonadal que se caracteriza por un aumento de las gonadotrofinas. Al ser estimuladas, las gónadas neonatales responden con una elevada producción de esteroides sexuales, los cuales disminuyen lentamente a valores bajos prepuberales hasta alcanzar la madurez sexual (Kolho y Huhtaniemi, 1989; Quigley, 2002; Mann y Fraser, 1996). Ese incremento de hormonas sexuales se describió en varios mamíferos tal como en gato (Faya y col., 2013), mono (Robinson y Bridson, 1978), cobayo (Rigaudiere, 1976), rata (Döhler y Wuttke, 1975) y hombre (Forest y col., 1973). Se conoce que el medio hormonal neonatal afecta profundamente el patrón de diferenciación sexual definitivo del sistema nervioso central, así como también la neuroquímica, fisiología reproductiva y el comportamiento (Gorski, 1985; Beyer y Feder, 1987; Gutierrez y col., 2005). Es claro entonces, que existe un periodo crítico de desarrollo postnatal durante el cual la exposición a un agente disruptor podría afectar la competencia reproductiva posterior (Pryor y col., 2000). Un disruptor es una sustancia exógena con efectos deletéreos en las funciones hormonales de un individuo debido a cambios en la función endócrina (Cravedi y col., 2007). En el felino doméstico este periodo de vulnerabilidad con elevadas concentraciones de esteroides sexuales se extiende hasta la cuarta y quinta semana de vida en hembras y machos, respectivamente. Este período es seguido por un descenso hormonal a concentraciones basales que se mantienen hasta la prepubertad (Faya y col., 2013).

Es ampliamente conocido que los gatos domésticos son extremadamente prolíficos en su reproducción y que la sobrepoblación es una problemática severa a nivel mundial (ACCD, 2002, 2004). Además, ciertas características únicas del ciclo reproductivo como el inicio temprano de la pubertad, los ciclos poliéstricos, la alta fertilidad, la presencia de celo durante la lactancia, y la fase luteal corta o inexistente profundizan la condición de prolificidad (Griffin, 2001b). Frente a esta problemática de sobrepoblación indeseada, la contracepción quirúrgica es de primera elección como herramienta de control poblacional. No obstante, ese método es costoso, invasivo y conlleva una metodología laboriosa (Mehl y col., 2017). Es por esto que, métodos alternativos hormonales tal como andrógenos y análogos de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), están siendo estudiados como alternativas farmacológicas contraceptivas (Kutzler, 2006).

Los andrógenos son esteroides derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno, cuyas funciones principales consisten en completar la diferenciación sexual del hipotálamo, la maduración y función de los órganos sexuales y el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos (Dohle y col., 2003). Los andrógenos ejercen una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo, ocasionando una disminución de la secreción de GnRH y, consecuentemente de gonadotrofinas hipofisarias, resultando en supresión de la espermatogénesis y de la actividad ovárica en el macho y la hembra, respectivamente (Romagnoli, 2010).

Cabe destacar que la androgenización postnatal en ratas retrasó la pubertad y disminuyó la ciclicidad ovárica (Gellert y Wilson, 1979), en gatas indujo la anovulación en un 25% de los animales (Demaldé y col., 2016), en cerdos se describió una reducción del peso testicular y de la concentración de T sérica (Ventanas y col., 1992) y en perras resultó en esterilidad (Beach, 1983).

Por su parte, los análogos de GnRH, que incluyen agonistas y antagonistas se sintetizaron por sustitución de aminoácidos a partir la molécula nativa de GnRH, resultando con una potencia y duración de la efectividad mayor. A diferencia de los agonistas, los antagonistas bloquean competitivamente los receptores de GnRH conduciendo a una inmediata supresión hipofisiaria, dosis dependiente, sin estimulación inicial del eje gonadal (Gobello, 2012). Resultados promisorios en el retraso de la pubertad se describieron con la administración neonatal de agonistas en gatos (Carranza y col., 2014) y antagonistas en ratas (Kolho y col., 1988).

En esta Tesis se estudió el efecto reproductivo de la disrupción hormonal en el periodo crítico de desarrollo postnatal utilizando un andrógeno sintético, de larga acción y ampliamente disponible en el mercado, el enantato de testosterona, (Plumb, 2006) y un potente y seguro antagonista de GnRH de tercera generación, el acyline (Gobello, 2012) en gatos domésticos con fines contraceptivos.

Referencias

1. Alliance for contraception in cats and dogs (ACCD). Proceedings Book of the International Symposium of Non surgical methods for pet population control. Georgia, USA 2002, p. 110.

Alliance for contraception in cats and dogs (ACCD). Proceedings Book of the
 2nd International Symposium of Non surgical methods for pet population control.
 Colorado, USA 2004, p. 204.

3. Beach F, Buehler M, Dunbar I. Sexual cycles in female dogs treated with androgen during development. <u>Behav Neural Biol</u>. 1983; 38: 1-31.

4. Beyer C, Feder H. Sex steroids and afferent input: their roles in brain sexual differentiation. Annu Rev Physiol. 1987; 49: 349-364.

5. Carranza A, Faya M, Merlo M, Batista P, Gobello C. Effect of GnRH analogs in postnatal domestic cats. <u>Theriogenology</u>. 2014; 82: 138-143.

6. Cravedi J, Zalko D, Savouret J, Menuet A, Jegou B. The concept of endocrine disruption and human health. <u>Med Sci</u>. 2007; 23: 198-204.

7. da Silva T, da Silva L, Uchoa D, Monteiro C, de Aguiar Thomaz L. Sexual characteristics of domestic queens kept in a natural equatorial photoperiod. <u>Theriogenology</u>. 2006; 66: 1476-1481.

 Demaldé L, Merlo M, Vercellini R, Barbeito C, Fernandez P, Gobello C.
 Disrupting effect of androgens in postnatal female domestic cats. <u>Anim Reprod</u> <u>Sci</u>. 2014; 171: 65-71.

9. Döhler K, Wuttke W. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. <u>Endocrinology</u>. 1975; 9: 898-907.

10. Dohle G, Smit M, Weber R. Androgens and male fertility. <u>World J Urol</u>. 2003;21: 341-345.

11. Feldman EC, Nelson RW. Feline reproduction. En: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 3era. Edición. St. Louis, Missouri, USA, Ed.WB Saunders Co, 2004, p. 1016-1045.

Farstad W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction.
 <u>Anim Reprod Sci</u>. 2000; 60: 375-387.

13. Faya M, Carranza A, Priotto M, Abeya M, Diaz J, Gobello C. Domestic queens under natural temperate photoperiod do not manifest seasonal anestrus. <u>Anim Reprod Sci</u>. 2011; 129: 78-81.

14. Faya M, Carranza A, Miotti R, Ponchón T, Furlan P, Gobello C. Fecal estradiol-17 β and testosterone in prepubertal domestic cats. <u>Theriogenology</u>. 2013; 80: 584-586.

15. Forest MG, Cathiard AM, Bertrand JA. Total and unbound testosterone levels in the newborn and in normal and hypogonadal children: use of a sensitive radioimmunoassay for testosterone. <u>J Clin Endocr Metab</u>. 1973; 36: 1132-1142.

16. Foster MA, Hisaw FL. Experimental ovulation and the resulting pseudopregnancy in anoestrous cats. <u>Anat Rec</u>. 1935; 62: 75-93.

17. Gellert RJ, Wilson C. Reproductive function in rats exposed prenatally to pesticides and polychlorinated biphenyls (PCB). <u>Environ Res</u>. 1979; 18:437-443.

18. Gobello C. Fisiología Reproductiva Felina. Reproducción en caninos y felinos domesticos. 2006th ed. Buenos Aires, Argentina, Intermédica, 2006, p. 253-263.

 Gobello C. Effects of GnRH Antagonists vs Agonists in Domestic Carnivores, a Review. <u>Reprod Domest Anim</u>. 2012; 47: 373-376.

20. Goodrowe KL, Howard JG, Schmidt PM, Wildt DE. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and invitro fertilization. <u>J Reprod Fertil Suppl.</u> 1989; 39:73-90.

21. Gorski R. Sexual differentiation of the brain: possible mechanisms and implications. <u>Can J Physiol Pharmacol</u>. 1985; 63: 577-94.

22. Greulich W. Artificially induced ovulation in the cat (Felis domestica). <u>Anat</u> <u>Rec</u>. 1934; 58: 217-224.

23. Griffin B. Prolific Cats: The Estrous Cycle. <u>Compendium</u>. 2001a; 23: 1049-57.

24. Griffin B. Prolific cats: the impact of their fertility on the welfare of the species. <u>Comp Contin Edu Pract Vet</u>. 2001b; 23: 1058-69.

25. Gutiérrez HH, Onofre MV, Rosado-García A, Torres A. Sexual differentiation in the central nervous system. <u>Vet Mex</u>. 2005; 36: 339-360.

26. Jemmett JE, Evans JM. A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. <u>J Small Anim Pract</u>. 1977; 18: 31-37.

27. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS. The feline estrous cycle. En: Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia, Saunders WB, 2001, p. 396-405.
28. Kolho KL, Nikula H, Huhtaniemi I. Sexual maturation of male rats treated postnatally with a gonadotrophin-releasing hormone antagonist. <u>J Endocrinol</u>. 1988; 116: 241-246.

29. Kolho K, Huhtaniemi I. Suppression of pituitary-testis function in rats treated neonatally with a gonadotrophin-releasing hormone agonist and antagonist: acute and long-term effects. <u>J Endocrinol</u>. 1989; 123: 83-91.

30. Kutzler M, Anna W. Non-surgical methods of contraception and sterilization. <u>Theriogenology</u>. 2006; 66: 514-525.

31. Kustritz M. Applied Small Animal Andrology. En P. Lorton P, Chenoweth J Animal Andrology. Croydon, Reino Unido, Ed CABI, 2014, p. 177-196.

32. Little, Susan E. Female reproduction. The Cat. 2012; 1195-1227.

33. Mann D, Fraser H. The neonatal period: a critical interval in male primate development. <u>J Endocrino</u>l. 1996; 149: 191-197.

34. Mehl N, Srisuwatanasagul S, Swangchan-Uthai T, Sirivaidyapong S, Khalid M. GnRH-agonist implants suppress reproductive function and affects ovarian LHR and FSHR expression in prepubertal female cats. <u>Theriogenology</u>. 2017; 87: 250-258.

35. Neuzeret PC, Gormand F, Reix P, Parrot S, Sastre JP, Buda C, Guidon G, Sakai K, Lin JS. A new animal model of obstructive sleep apnea responding to continuous positive airway pressure. <u>Sleep</u>. 2011; 34: 541-548.

36. Nutter FB, Levine JF, Stoskopf MK. Reproductive capacity of free-roaming domestic cats and kitten survival rate. <u>J Am Vet Med Assoc</u>. 2004; 225:1399-1402.

37. Paape SR, Shille VM, Seto H, Stabenfeldt GU. Luteal activity in the pseudopregnant cat. <u>Biol Reprod.</u> 1975; 13: 470-474.

Pope CE. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids.
 <u>Theriogenology</u>. 2000; 53: 163-174.

39. Pryor J, Hughes C, Foster W, Hales B, Robaire B. Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. <u>Environ Health Perspect</u>. 2000; 108: 491-503.

40. Plumb DC. Manual de farmacología veterinaria. 5ta. ed. Buenos Aires. Argentina. Ed Inter-Médica, 2006, p. 680-82.

41. Quigley C. The postnatal gonadotropin and sex steroid surge-insights from the androgen insensitivity syndrome. <u>J Clin Endocrinol Metab</u>. 2002; 87: 24-8.

42. Rigaudiere N, Pelardy G, Robert A, Delost P. Changes in the concentrations of testosterone and androstenedione in the plasma and testis of the guinea-pig from birth to death. <u>Reproduction</u>. 1976; 48: 291-300.

 Robertson, S. A review of feral cat control. <u>J Feline Med Surg</u>. 2008; 10: 366-375.

44. Robinson JA, Bridson WE. Neonatal hormone patterns in the macaque. I. Steroids. <u>Biol Reprod</u>. 1978; 19: 773-778.

45. Romagnoli, S. Reproduction control—new developments, old debates. J Feline Med Surg. 2010; 12: 724-724. Schmidt PM. Feline breeding management. <u>Vet Clin North Am Small Anim</u> <u>Pract</u>. 1986; 16: 435-449.

47. Scott MG, Scott PP. Post-natal development of the testis and epididymis in the cat. J Physiol. 1957; 136: 40-41.

48. Scott KC, Levy JK, Crawford PC. Characteristics of free-roaming cats evaluated in a trap-neuter-return program. J Am Vet Med Assoc. 2002; 15: 1136-1138.

49. Sojka NJ. The male reproductive system. In Morrow DA (ed): Current Therapy in Theriogenology. Philadelphia, WB Saunders, 1980, p. 844-845.

50. Ventanas J, López-Bote CJ, García C. Further signs of postnatal sexual differentiation in pigs. <u>Exp Clin Endocrinol Diabetes</u>. 1992; 99: 119-122.

51. Verstegen J. Contraception and pregnancy termination. Textbook of veterinary internal medicine diseases of the dog and cat. 5th ed. California, USA, WB Saunders Company, 2000, p. 1542-1543.

52. Vincent A, Mamzer H, Ng Z, Farkas KJ. People and their pets in the times of the COVID-19 pandemic. <u>Society Register</u>. 2020; 4: 111-128.

53. Wildt DE, Schiewe MC, Schmidt PM, Goodrowe KL, Howard JG, Phillips LG, O'Brien SJ, Bush M. Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wildlife. <u>Theriogenology</u>. 1986; 25: 33-51.

CAPÍTULO I

EFECTO DEL ANTAGONISTA DE GNRH, ACYLINE, EN FELINOS MACHOS Y HEMBRAS POSTNATALES

Introducción

Diversas alternativas a la esterilización quirúrgica están siendo investigadas en los felinos incluyendo la disrupción endócrina postnatal (Carranza y col., 2014). En mamíferos, la función del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal en el período neonatal temprano es esencial para la normal maduración sexual y el desarrollo apropiado de las funciones sexuales en el adulto (Kolho y Huhtaniemi, 1989). El período neonatal temprano es bien conocido por su vulnerabilidad reproductiva en la mayoría de los mamíferos (Mann y Fraser, 1996; Pryor y col., 2000).

Además, como especie altricial, los felinos nacen con un alto grado de inmadurez en relación a otras especies (Wallen y Baun, 2002). Las gónadas del gato doméstico, al igual que las de otros mamíferos, son muy activas al nacimiento y durante las primeras semanas postnatales, momento en que se produce un aumento de la concentración de esteroides sexuales fecales (Faya y col., 2013). Así la disrupción endocrina de este periodo temprano de actividad tendría efectos adversos en la fertilidad futura del animal (Pryor y col., 2000).

Moura y Erickson (1997) sugirieron que las concentraciones de gonadotrofinas durante el periodo prepuberal tienen valor en el potencial reproductivo en la madurez. De hecho, Chandolia y col., (1997) señaló que la administración de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) durante dos semanas en el periodo postnatal temprano tiene un efecto negativo en el desarrollo y función testicular en terneros. Además, estos análogos disminuyeron el tamaño gonadal y la cantidad de folículos ováricos en ratas (Kolho y Huhtaniemi, 1989; Van den Dungen y col., 1989; Van Cappellen y col., 1989; Meijs-Roelofs y col., 1990). También, la administración postnatal del antagonista de GnRH, Org. 30276, en ratas (Van Cappellen y col., 1989) y antide en monos (Lunn y col., 1994), resultó en una disminución de la concentración de gonadotrofinas plasmáticas.

Otro reporte indicó que la administración postnatal de análogos de GnRH, retrasó la pubertad en machos y hembras de diversas especies como roedores (Kolho y col., 1988), felinos domésticos (Carranza y col., 2014) y caninos (Faya y col., 2018). Así, cuando se administró el potente antagonista de GnRH de tercera generación, acyline, a dosis bajas (33µg/100g) seriadas en gatos postnatales, se logró sólo una disminución parcial de las concentraciones de testosterona (T) y 17ß estradiol (E2) fecales durante las primeras semanas postnatales (Carranza y col., 2014). El efecto de los antagonistas de GnRH postnatal en las gónadas no se ha reportado para esta especie. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto físico, hormonal, histológico y reproductivo, de la administración postnatal de dos dosis altas de acyline en felinos domésticos.

Materiales y métodos

Animales

Para este estudio, se incluyeron nueve hembras y diez machos recién nacidos, pertenecientes a la Colonia experimental felina de la Universidad Nacional de La Plata. Al nacimiento, los animales fueron sexados de acuerdo a la distancia anogenital y debidamente identificados. Los gatos se criaron en un ambiente con 14 horas de luz por día, enriquecido apropiadamente para la especie y destetados a los 60 días de vida. Luego se alimentaron con balanceado comercial *premium* para cachorro y agua *ad libitum*. Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad Nacional de La Plata, y el experimento fue conducido según las normas establecidas por "*The guide of The Care and Use of Laboratory Animals*", USA.

Protocolos farmacológicos

Los felinos, recién nacidos y hermanos de camada, fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes grupos de tratamientos dentro de las primeras 24 horas de vida:

- Acyline (Contraception & Reproductive Health Branch Center for Population Research, NIH, Bethesda, MD, USA) 2.2 mg/100g subcutáneo, semanalmente durante 2 semanas (ACY; hembras n=5; machos n=6).

- Placebo: solución fisiológica subcutáneo (PL; hembras n=4; machos n=4).

El acyline [acetyl-D2Nal-D4CIPhe-D3PalSer-Aph(ac)-Daph(Ac)-Leu-Lys(lpr)-Pro-D-Ala-Nh2] fue proporcionado en forma de polvo liofilizado, el cual fue suspendido en agua destilada para obtener una concentración final de 2,2 mg/ml. La dosis fue seleccionada de acuerdo a estudios previos con resultados parciales (Carranza y col., 2014) y pruebas piloto en la especie.

Seguimiento

Todos los felinos fueron evaluados hasta los primeros indicios de pubertad. La misma se definió, para las hembras como la presencia de más del 80% de células superficiales queratinizadas y fondo clarificado en las citologías vaginales (Mills, 1979). En el caso de los machos, la pubertad se definió por la presencia de espículas peneanas y la separación balano-prepucial (Van den Dungen y col., 1989). El seguimiento de los animales incluyó además la evaluación del comportamiento y el examen físico, así como también la determinación hormonal de E2 y T fecal en hembras y machos, respectivamente. Finalizando el periodo de seguimiento se realizaron pruebas de fertilidad *in vivo*.

Examen físico y de comportamiento

La evaluación física constó de la determinación semanal de peso (kg), altura a la cruz (cm) y largo corporal (cm; desde la articulación escápulo-humeral hasta la tuberosidad isquiática) como indicadores de crecimiento somático. Además, los felinos se observaron por al menos 2 horas diarias a fin de examinar el comportamiento sexual típico de la especie y la eventual aparición de posibles efectos colaterales clínicos. La conducta femenina de estro considerada en este experimento incluyó vocalizaciones, inquietud, fricciones, lateralización de la cola y lordosis, entre otros (Lein y col., 1982). En los machos, se observó la aproximación hacia la hembra, reacción de Flehmen, contacto nariz-nariz y con la región perineal de la gata, así como también los intentos de monta (Johnston y col., 2001). Así mismo, los machos se examinaron semanalmente a fin de detectar la presencia de espículas peneanas, clasificadas como grado 0 (sin espículas), grado 1 (aparición incipiente de espículas), grado 2 (espículas cornificadas) y la separación balano-prepucial, completa o incompleta (Johnston y col., 2001).

Citología vaginal

Se realizaron citologías vaginales tres veces por semana, a partir de los 3 meses de edad. Las mismas se llevaron a cabo con hisopos embebidos en solución fisiológica estéril y posteriormente las muestras fueron teñidas con tinción 15[®] para su observación con microscopio óptico (Olympus BX50, Tokyo, Japan). El análisis y clasificación se realizó de acuerdo a Mills y col. (1979).

Recolección de materia fecal, extracción y determinación hormonal

Las muestras fecales se recolectaron las semanas 1, 2, 3, 4, 7 y 10 postnatales, para la determinación de E2 (ng/g) y T (ng/g). Para este propósito, cada gato fue confinado individualmente en una habitación con bandejas sanitarias limpias durante una noche. Durante las primeras 4 semanas de vida, los cachorros fueron estimulados con supositorios de glicerina pediátricos a fin de obtener las muestras. La materia fecal fue almacenada en bolsas plásticas individuales e identificadas a -20°C hasta su procesamiento. Para la extracción de E2 y T se llevó a cabo el método descripto por Brown y col. (2004) y su posterior determinación se realizó con un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (Elecsys Testo II y Estradiol II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Todos los datos fecales fueron expresados en base a peso húmedo (Faya y col. 2013).

Prueba de fertilidad in vivo

En todo el celo puberal, las gatas se expusieron a un gato macho de fertilidad probada de la colonia. Del mismo modo los machos experimentales púberes se expusieron a hembras adultas de la colonia durante un periodo de estro completo. Se observó la libido de las hembras y machos, la cual se clasificó como 0 (ningún interés por sexo puesto), 1 (poco interés) y 2 (repetidas montas). Se verificaron los apareamientos por observación y/o detección de espermatozoides en frotis vaginales de las hembras. A los 21 días de comenzado el estro se realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonografía bidimensional en todas las hembras (Mattoon y Nyland, 2002).

Procedimientos quirúrgicos

Inmediatamente después del diagnóstico de gestación y de las pruebas de fertilidad, todas las hembras (Arnold, 2002) y los machos (Boothe, 2002) fueron esterilizados. Para este procedimiento se realizó una premedicación con sulfato de atropina (Sulfato de atropina, John Martin; 0,04mg/kg, im), maleato de acepromacina (Acedan, Holliday; 0,03mg/kg, im), y butorfanol (TorbutolPlus, Fort Dodge; 0,2 mg/kg, im). La anestesia se indujo con propofol (Propovet, Richmond; 5 mg/kg, iv). En todos los casos, se procedió a la intubación endotraqueal y para el mantenimiento se utilizó un circuito cerrado de anestesia inhalatoria con isofluorano. La medicación postquirúrgica se basó en meloxicam (Meloxivet, John Martin; 0,1mg/kg) y antibioticoterapia, administrados vía subcutánea por única vez y se continuó oralmente los días posteriores. Inmediatamente después todos los felinos fueron ofrecidos en adopción responsable.

Examen macroscópico e histológico del ovario

Inmediatamente después de la cirugía, los ovarios escindidos fueron pesados (g), medidos usando un calibre Vernier (cm; largo y ancho) y se calculó el índice gonadosomático (%; França y Godinho, 2003). Luego los ovarios se seccionaron longitudinalmente, se fijaron en solución de Bouin durante 24 horas y posteriormente en alcohol 70% por 24 horas, para ser procesadas con la técnica histológica de rutina en parafina. Se realizaron cortes de 10 µm de espesor de todo

el ovario que fueron montados en portaobjetos, secados, desparafinados con una solución de xilol, luego rehidratados en soluciones graduadas de etanol (Suvarna y col., 2013).

Cada 40 cortes, se seleccionó uno para su tinción con hematoxilina-eosina (H&E). Posteriormente se visualizó en microscópio de luz a 10X y 25X para la determinación del número de folículos primordiales, primarios, secundarios, antrales y atrésicos según Bristol-Gould y Woodruff (2006). El número total de cada tipo folicular (Nt) de cada ovario se calculó de acuerdo a Gougeon y Chainy (1987)

 $N_{t} = N_{o} * S_{t} * t_{s} / S_{o} * d_{o}$

donde N_o = número de folículos observados en el ovario; S_t = número total de secciones realizadas en el ovario; t_s = ancho de las secciones (µm); S_o = número total de secciones teñidas y observadas y d_o = diámetro medio del núcleo de cada tipo folicular. Finalmente se sumaron los resultados de ambos ovarios de cada animal.

Examen macroscópico e histológico testicular

Inmediatamente después de la cirugía, los testículos fueron medidos (ancho, largo y profundidad, cm) usando un calibre Vernier y pesados (g). Además, se calculó el volumen testicular V=LxW²x0,52; L= largo; W= ancho (cm³; Lin y col., 2009) y el índice gonadosomático (%; França y Godinho, 2003).

Los testículos fueron seccionados longitudinalmente y se fijaron con solución de Bouin durante 24 horas y en una solución de alcohol 70% hasta ser embebido

en parafina. Luego se realizaron cortes seriados de 5 µm que fueron montados en portaobjetos, secados, desparafinados con una solución de xilol, rehidratados en soluciones graduadas de etanol y teñidos con hematoxilina eosina (Bancroft y col., 1990). Un testículo se dispuso para la evaluación histológica y el otro para inmunohistoquímica.

Las imágenes histológicas se obtuvieron de un microscopio (Olympus BX50, Tokyo, Japan; 10X or 40X) conectado a una videocámara digital RGB (Omax A35180U3, China) y digitalizadas en formato TIFF 24 bit. Se evaluaron 30 túbulos circulares del testículo y se midió el diámetro tubular (µm), la altura del epitelio tubular (µm), así como también el número de cada componente celular de la hilera germinal (espermatogonia, espermatocito primario, espermatocito secundario, espermátide redonda, espermátide elongada y espermatozoide) y células de Sértoli. Además, en veinte espacios intertubulares completos, se determinó el número de células de Leydig, y el área nuclear de las mismas (µm²). También se calculó la relación túbulo/intersticio y espermátide/Sértoli como índice de eficiencia de la espermatogénesis. Las imágenes fueron analizadas por planimetría (Image Pro Plus v6.0-Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).

Inmunohistoquímica

Las secciones de tacos en parafina de uno de los testículos se desparafinaron y los antígenos se pusieron al descubierto por un pre tratamiento con un buffer de citrato (pH=6). La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió usando peróxido de hidrógeno al 3% en metanol. Se utilizó suero de cabra (10%) y albúmina de suero bovino (BSA, 3%) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para bloquear los sitios de unión inespecífica seguido por la incubación con los anticuerpos primarios diluidos en PBS con 3% de BSA por una noche a 4°C de temperatura. Los anticuerpos utilizados fueron un anticuerpo policional de conejo anti-rata contra el clivaje de la cadena lateral de citocromo P450 (P450scc), (dilución 1: 200; USBiological, distribuido por Biomol, Hamburgo, Alemania; Roby y col., 1991; Gentil y col., 2012) y un anticuerpo policional de conejo contra el citocromo P450 bovino recombinante 17α -hidroxilasa (P450c17) (dilución 1: 500; Peterson y col., 2001; Gentil y col., 2012). En el segundo día, las muestras fueron incubadas con un polímero-potenciador (SuperVision-2 HRP Enhancer, DCS Innovative Diagnostic-System, Hamburgo, Alemania) seguido por una incubación con el reactivo de polímero (SuperVision-2 HRP-Polymer, DCS Innovative Diagnostic-System). Cada paso de la inmunohistoquímica se siguió por una instancia de lavado con PBST (PBS con 0.2% Tween 20) buffer (2x) y buffer de PBS (1x). Las señales inmunopositivas se visualizaron con DAB (DAB 2-komponenten kit, DCS ChromoLine, DCS Innovative Diagnostic-System) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los controles negativos se prepararon en buffer de PBS en la misma concentración que se usó para los anticuerpos primarios. Se utilizó un isotipo control de IgG de conejo de Laboratorios Vector. En el paso anterior, las muestras se lavaron, deshidrataron y montaron con Eukitt® (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Alemania). La evaluación de la inmunohistoquímica se realizó por un procesador de imágenes GIMP 2.8 (https:// www.gimp.org/) e ImageJ FIJI win-64 (https://imagej.net/ Fiji) para cuantificar el porcentaje del área inmunopositiva (PAI) y la intensidad de tinción (promedio de escala de grises; PEG) del tejido intersticial descripto anteriormente (Körber y Goericke-Pesch, 2019). PEG y PAI del tejido intersticial fue evaluado en 20 imágenes de 200X, seleccionadas aleatoriamente por muestra. Para permitir el análisis del tejido intersticial, los túbulos seminíferos, vasos sanguíneos y artefactos fueron recortados. Luego, las imágenes fueron transferidas a imágenes en escala de grises y se eligió subjetivamente el umbral individual para cada anticuerpo. Señales positivas por encima del umbral fueron utilizadas para la determinación de intensidad de tinción. Para la escala de grises, 0 fue definido como blanco y 225 como negro. El PAI fue evaluado usando la imagen binarizada en la escala de grises en la que el área negra, representa el área inmunopositiva teñida (Gentil y col., 2012; Körber y Goericke-Pesch, 2018, 2019).

Análisis estadístico

La normalidad de los datos se comprobó con la prueba de Shapiro Wilks. Los parámetros físicos, histológicos e inmunohistoquímicos se compararon a la pubertad entre los grupos (ACY vs. PL) por el test de Wilcoxon. La libido y preñez fueron comparadas en ambos grupos por medio de Fisher's Exact test. Para el análisis hormonal se usaron 2 ventanas de tiempo (VT1: primera a tercera semana vs. VT2: cuarta a décima semana) y se compararon por el test t Student pareado. En todos los casos los datos se expresaron como la media ± SEM. El nivel de significancia se fijó en P<0.05 (SPSS 17.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

Resultados

Parámetros físicos

Para el caso de las hembras no se hallaron diferencias a la pubertad entre los grupos ACY y PL para la edad (217,60 ± 8,96 vs. 187,25 ± 32,00 días; respectivamente, P> 0,05), altura a la cruz (23,60 ± 0,68 vs. 22,25 ± 0,63 cm; respectivamente, P> 0,1; **Figura 1**), largo corporal (29,00 ± 0,63 vs. 27,50 ± 0,29 cm; respectivamente, P> 0,1; **Figura 2**) y el peso corporal (2432,8 ± 152,92 vs. 2091,0 ± 145,37 g; respectivamente, P> 0,05; **Figura 3**). Los felinos machos no presentaron diferencias al alcanzar pubertad entre los grupos ACY y PL para la edad (236,5±19,7 vs. 221,7±23,7 días, respectivamente; P> 0,05; **Figura 4**), largo corporal (31,17± 0,48 vs. 29,75±0,25 cm, respectivamente; P> 0,05; **Figura 5**) y el peso corporal (3050,0±150 vs. 2780,0±280 g, respectivamente; P>0,05; **Figura 6**). Ninguno del resto de los animales presentó efectos clínicos adversos (P>0,1) ni alteraciones del comportamiento durante todo el periodo de estudio (P>0,1) a excepción de un gato del grupo ACY con criptorquidismo inguinal unilateral.

Figura 1: Altura a la cruz (media±SEM) desde el nacimiento a la pubertad de hembras tratadas postnatalmente con el antagonista GnRH acyline (ACY; n=5) o placebo (PL; n=4). No se hallaron diferencias entre los grupos (P>0,1). Las gatas ACY se representaron con círculos negros y los gatos PL con círculos blancos.



Figura 2: Largo corporal (media±SEM) desde el nacimiento hasta la pubertad de las hembras de la Figura 1. No se hallaron diferencias entre los grupos (P>0,1). Las gatas ACY se representaron con círculos negros y los gatos PL con círculos blancos.


Figura 3: Peso corporal (media±SEM) desde el nacimiento hasta la pubertad de las hembras de la Figura 1. No se hallaron diferencias entre los grupos (P>0,1). Las gatas ACY se representaron con círculos negros y los gatos PL con círculos blancos.



Figura 4: Altura a la cruz (media±SEM) desde el nacimiento a la pubertad de machos tratados postnatalmente con el antagonista GnRH acyline (ACY; n=6) o placebo (PL; n=4). No se hallaron diferencias entre los grupos (P>0,1). Los gatos ACY se representaron con círculos negros y los gatos PL con círculos blancos.



Figura 5: Largo corporal (media±SEM) desde el nacimiento hasta la pubertad de los machos de la Figura 4. No se hallaron diferencias entre los grupos (P>0,1). Los gatos ACY se representaron con círculos negros y los gatos PL con círculos blancos.



Figura 6: Peso corporal (media±SEM) desde el nacimiento hasta la pubertad de los machos de la Figura 4. No se hallaron diferencias entre los grupos (P>0,1). Los gatos ACY se representaron con círculos negros y los gatos PL con círculos blancos.



El grado de libido presentado por los gatos de los grupos ACY y PL no mostraron diferencias en hembras (P> 0,1) ni en machos (P> 0,1; **Tabla 1**). Todas las hembras de ambos grupos recibieron varios servicios. Cuatro (4/4) gatas del grupo PL y cuatro (4/5) del grupo ACY, quedaron preñadas (P>0,1). Por su parte, todos los machos realizaron servicios (P>0,1) y dejaron preñadas a las hembras (P>0,1).

Tabla 1: Grado de libido (escala 0, 1 y 2) a la pubertad de machos de la Figura 1 y hembras de la Figura 4. No se encontraron diferencias en ninguno de los casos (P>0,1).

	Hembras		Machos	
Libido	Acyline	Placebo	Acyline	Placebo
Grado 1	1/5	1/4	3/6	2/4
Grado 2	4/5	3/4	3/6	2/4

Concentraciones hormonales

A pesar de no ser estadísticamente significativo, durante las primeras 2 semanas, las concentraciones de E2 fecales fueron menores en las hembras ACY (P>0,05). Durante VT2, ambos grupos de hembras paulatinamente tendieron a concentraciones basales (P>0,05; **Figura 7**). Contrariamente en los machos, la T fecal se encontró significativamente descendida en el grupo ACY en las primeras 3 semanas de vida, VT1 (P<0,05). Durante VT2, ambos grupos de machos alcanzaron concentraciones basales (P>0,05; **Figura 8**).

Figura 7: Concentración de 17 β -estradiol fecal (E2; media±SEM) desde el nacimiento hasta finalizado el periodo de seguimiento, de las hembras de la Figura 4. La concentración de E2 fecal no presentó diferencias entre los grupos de hembras (P>0,05). Las gatas ACY se representaron con círculos negros y los gatos PL con círculos blancos.



Figura 8: Concentración de testosterona fecal (T; media \pm SEM) desde el nacimiento hasta finalizado el periodo de seguimiento, de los machos de la Figura 1. Los asteriscos representan diferencias (P<0.05). Los gatos ACY se representaron con círculos negros y los gatos PL con círculos blancos.



Examen macroscópico e histológico de las gónadas

Los parámetros macroscópicos ováricos que incluyen peso, ancho, largo e índice gonadosomático, no mostraron diferencias entre los grupos (P >0,05; **Tabla 2**). También, las gónadas de ambos grupos de hembras presentaron cuerpos lúteos. El análisis microscópico de las secciones gonadales permitió una estimación de la población folicular ovárica. Para el caso de folículos preantrales, no se hallaron diferencias entre las hembras de ambos grupos (P >0,05; **Figura 9**) mientras que la población antral, se encontró disminuida en el grupo ACY (P <0,05; **Tabla 3**).

Los parámetros macroscópicos testiculares que abarcaron el peso, volumen e índice gonadosomático no revelaron diferencias entre los grupos (P >0,1; **Tabla** **4**). El examen histológico testicular demostró que el grupo ACY presentó menor altura del epitelio seminal (P < 0,01) debido a la disminución de algunos tipos celulares de la hilera germinal tales como espermatogonias (P < 0,01), espermátides redondas y elongadas (P < 0,05) y espermatozoides (P < 0,05). Así mismo los gatos del grupo ACY presentaron una mayor área de la luz tubular (P < 0,01) y mayor presencia de detritos en su interior (P < 0,01) comparado con el grupo PL (**Tabla 5**; **Figura 10** A y B). Finalmente, la relación espermátide/Sértoli se encontró también reducida en los gatos del grupo ACY (P < 0,05).

Tabla 2: Parámetros ováricos macroscópicos (media±SEM) a la pubertad de hembras de la Figura 4. No se encontraron diferencias entre los tratamientos para ninguno de los parámetros estudiados (P>0,1).

Parámetro	Acyline	Placebo
Peso ovárico (g)	0,30±0,02	0,25±0,03
Largo ovárico (mm)	11,50±0,48	10,88±0,30
Ancho ovárico (mm)	5,90±0,31	5,63±0,18
Índice gonadosomático (%)	0,021±0,00	0,024±0,00

Figura 9: Cortes histológicos de corteza ovárica de las gatas ACY (A) y PL (B) de la Figura 4. Se observa la presencia de folículos primordiales (llave), primarios (flecha fina) y secundarios (flecha gruesa) (H&E; 10X).





Tabla 3: Estructuras ováricas histológicas (media \pm SEM) de hembras de la Figura 4. Los distintos superíndices en una misma línea indican diferencias entre los grupos (P<0,05).

Folículos	Acyline	Placebo
Primordial	192.236 ± 32.086^{a}	176.807 ± 51.767^{a}
Primario	8.915 ± 2.234^{a}	8.885 ± 1.655^{a}
Secundario	1.295 ± 284^a	991 ± 441^{a}
Antral	47 ± 16^{a}	141 ± 15^{b}
Atrésico	2.857 ± 382^a	3.184 ± 560^{a}
Total	205.35	190.01

Tabla 4: Parámetros testiculares macroscópicos (media±SEM) a la pubertad de machos de machos de la Figura 1. No se encontraron diferencias entre los tratamientos para ninguno de los parámetros estudiados (P>0,1).

Parámetro	Acyline	Placebo
Peso testicular (g)	1,70+0,11	1,65+0,01
Volumen testicular (cm ³)	1,92±0,09	1,33±0,65
Índice gonadosomático (%)	0,08±0,00	0,11±0,00

Tabla 5: Estructuras histológicas testiculares (media \pm SEM) de machos de la Figura 1. Los distintos superíndices en una misma línea indican diferencias (P<0,05) entre los grupos.

	Acyline	Placebo
Diámetro testicular (µm)	205,54 <u>+</u> 2,38 ^a	194,54 <u>+</u> 2,97 ^b
Altura de epitelio germinal (µm)	19,42 <u>+</u> 0,5 ^a	38,35 <u>+</u> 1,28 ^b
Área luminal (µm ²)	6.689,55±319,12 ^a	4.564,56±252,33 ^b
Detritos (µm ²)	1737,68±225,05ª	111,98±18,55 ^b
Espermatogonia/túbulo	2,93±0,15 ^a	5,14±0,21 ^b
Espermatocito primario/túbulo	61,36 <u>+</u> 1,78 ^a	67,68 <u>+</u> 2,70 ^a
Espermatocito secundario/túbulo	0,00 ^a	0,01 <u>+</u> 0,01 ^a
Espermátide redonda/túbulo	35,29 <u>+</u> 3,21°	49,27 <u>+</u> 4,17 ^d
Espermátide elongada/túbulo	8,98 <u>+</u> 1,85°	11,94 <u>+</u> 2,34 ^d

ı

Figura 10: Cortes histológicos de túbulo testicular de los gatos de la Figura 1. A) PL: epitelio germinal normal. B) ACY: epitelio germinal delgado conteniendo sólo espermatogonias, espermatocitos primarios y células de Sértoli. Se observa cúmulo de detritos en el lumen tubular (H&E; 25X).



Examen inmunohistoquímico testicular

La inmunohistoquímica para P450SCC y P450c17 reveló tinción específica en las células de Leydig de ambos grupos (**Figura 11**). A pesar de que con PAI no se encontraron diferencias tanto para P450scc (*P*>0.1) como para P450c17

(P>0.1) entre grupos, el PEG fue menor para P450c17 (P<0.01) y presentó una tendencia a decrecer para P450scc (P<0.1) en gatos ACY (**Figura 12**).

Figura 11: Inmunotinción para P450SCC (A-C) y P450c17 (D-F). A y D: Tejido testicular gato PL. B y E: tejido testicular en gato ACY. C y F: controles de isótopos. A-B: Células de Leydig teñidas inmunopositivas para P450SCC y D-E: Células de Leydig teñidas inmunopositivas para P450c17. No se observó tinción en los controles de isótipos (C-F). Células de Leydig se indican con flechas; 400X (A-E), 200X (F).



Figura 12: Porcentaje del área inmunopositiva (PAI) y promedio de escala de grises (PEG) para P450SCC y P450c17 (media±SEM) en gatos tratados neonatalmente con ACY y PL. Los asteriscos representan diferencias (P<0.01).



Discusión

La elevada dosis postnatal del antagonista de GnRH utilizada en este experimento en los cachorros felinos de ambos sexos no modificó la edad de aparición de la pubertad, así como tampoco el peso corporal. Resultados similares se reportaron en ratas tratadas postnatalmente con antagonistas GnRH donde la aparición de la pubertad tampoco se postergó con respecto a los controles (Van den Dungen y col., 1989; Meijs-Roelofs y col., 1990). También, en gatos dosis más bajas de acyline postnatal no modificaron la edad de la pubertad, así como tampoco el peso a la pubertad (Carranza y col., 2014).

En concordancia con lo descripto previamente sobre la seguridad de los análogos de GnRH (Gobello, 2012), no hubo efectos clínicos adversos en estos felinos, excepto un caso de criptorquidismo inguinal unilateral. De forma similar, dos perros tratados postnatalmente con un agonista GnRH presentaron criptorquidismo bilateral a la pubertad (Faya y col., 2018). De igual manera, ratas machos tratadas postnatalmente con el antagonista de GnRH, antide, presentaron un retraso en el descenso testicular (Simon y col., 2011). Considerando estos hallazgos, se infiere que la insuficiente concentración de andrógenos perinatales podría prevenir o retrasar el descenso testicular.

Los resultados de libido en el presente estudio se encuentran en concordancia con trabajos previos en felinos (Carranza y col., 2014) y caninos (Faya y col., 2018) post administración neonatal de análogos GnRH donde la libido tampoco se vio afectada a la pubertad.

Así mismo, todas las hembras tratadas con acyline quedaron preñadas, describiéndose resultados similares en ratas tratadas con antagonista GnRH (Van den Dungen y col., 1989; Trimino y col., 1993), al igual que perras tratadas con agonistas de GnRH también quedaron preñadas (Faya y col., 2018).

La alta dosis del antagonista usada en este estudio no logó disminuir las concentraciones fecales de E2 a niveles bajos prepuberales durante las primeras semanas de vida. En concordancia con dosis menores de acyline en estudios postnatales anteriores en felinos domésticos, tampoco lograron disminución temprana significativa del E2 (Carranza y col., 2014). A pesar de que en este experimento las diferencias entre los grupos de hembras no fueron estadísticamente significativas durante las primeras 2 semanas de vida, las concentraciones de E2 fecales fueron menores en las hembras tratadas con el antagonista. La falta de significancia en este género pudo ser debida al escaso número de animales o a la variabilidad de los valores obtenidos. Contrariamente,

De la misma manera, el uso de análogos de GnRH posnatal en gatos (Carranza y col., 2014), en monos (Mann y col., 1989) y ratas (Simon y col., 2011; Sharpe y col., 2003) disminuyeron la T con respecto al grupo placebo. Así, el género parecería tener un efecto en el grado de supresión lograda con un mismo antagonista postnatal.

Por otro lado, la estimación del número total de folículos preantrales de las hembras placebo concuerdan con lo observado previamente en ovejas (160.000; Driancourt, 1991), vacas (132.000; Erickson, 1966 y 109.673; Silva-Santos y col., 2011) y perras prepuberes (135.467; Lunardon y col., 2015), aunque mayor a lo evaluado previamente, por ovario, en gatas (37.863; Carrijo y col., 2010). Esta discrepancia en la especie felina podría deberse a las diferencias etarias con las gatas usadas en el trabajo de Carrijo y col. (2010). Es ampliamente aceptado que el pool folicular disminuye con el aumento de la edad de la hembra (Erickson, 1966). También, pueden haber influido diferencias técnicas entre los laboratorios. Así mismo, la proporción de folículos encontrados en estas gatas resultó consistente con lo reportado previamente en perras (Lunardon y col., 2015; Jivago y col., 2018), vacas (Lucci y col., 2002; Erickson, 1966), gatas (Carrijo y col., 2010) y ovejas (Land, 1970).

De acuerdo a nuestros resultados, no se vio afectada la población de folículos preantrales de las gatas tratadas tempranamente con acyline. Este hallazgo difiere con lo reportado previamente en ratas tratadas neonatalmente con antagonistas de GnRH, en las que se observó una reducción del 50% de los folículos preantrales (Van Cappellen y col., 1989). La discrepancia en el efecto producido por el antagonista sobre el ovario se podría explicar por los distintos antagonistas y dosis usados o bien en la sensibilidad al tratamiento postnatal en diferentes especies (Crews y col., 2000).

En este trabajo, se vio disminuida la población de folículos antrales en las gatas tratadas con el antagonista. Así, el tratamiento realizado podría haber provocado una disminución del número de folículos reclutados para alcanzar el estadio antral. El análisis de estos hallazgos paralelamente a las concentraciones hormonales disminuidas, sugieren que serían necesarias concentraciones normales de E2 postnatales para el reclutamiento fisiológico folicular a la pubertad. Este hallazgo concuerda con lo descripto en ratas tratadas neonatalmente con el antagonista de GnRH, detirelix donde el recuento folicular antral fue menor con respecto a un grupo placebo (Muir y col., 1999).

Los parámetros macroscópicos testiculares, así como su relación con el peso corporal, no fueron alterados por el tratamiento con acyline. Contrariamente, el tratamiento postnatal con antagonista de GnRH, antarelix (10 mg/kg) en ratas (Sharpe y col., 2003) redujo el peso testicular a la pubertad. Estas discrepancias pueden ser atribuidas a la especie, fármaco administrado o diferencias metodológicas entre reportes.

En concordancia con los hallazgos histológicos testiculares de estos gatos, fue encontrado un deterioro severo de la espermatogénesis en ratas tratadas postnatalmente con antagonistas de GnRH (Huhtaniemi, 1986). Un reporte previo de felinos domésticos tratados neonatalmente con un agonista de GnRH, deslorelina, evidenció disminución de la altura del epitelio germinal a la pubertad, así como también de la relación espermátide/Sértoli (Carranza y col., 2015). En otro estudio en ratas neonatas tratadas con antagonista GnRH el número total de células de Leydig y el volumen nuclear de estas células, fue comparable con el volumen de los controles a la madurez reproductiva, (Sharpe y col., 2003). De manera similar, el área nuclear y el número de células de Leydig no fue afectado en los gatos de nuestro estudio. Esto sugiriere que la funcionalidad de las células de Leydig de los adultos no es afectada por la deprivación temprana de andrógenos.

Los hallazgos de la inmunohistoquímica testicular demostraron que sólo el PEG para la expresión de P450c17 fue menor en gatos tratados con acyline, mientras que el PAI no mostró diferencias tanto para P450scc ni para P450c17 en ninguno de los grupos. Estos resultados sugieren que en los felinos la T postnatal no tendrían un rol en la producción androgénica adulta.

Los gatos machos y hembras de este estudio fueron fértiles a la pubertad. Reportes previos donde se realizaron tratamientos postnatales con análogos de GnRH en ratas hembras (Trimino, 1993; van den Dungen y col., 1989; Simon y col., 2012) y en cerdos (Ziecik y col., 1989) coinciden con nuestros resultados. A diferencia de estos últimos, otros trabajos han reportado infertilidad en ratas machos tratadas con antagonistas GnRH (van den Dungen y col., 1989; Kolho y col., 1988). La disparidad de estos resultados respecto a los de nuestro trabajo podría adjudicarse a los fármacos usados, las distintas dosis, o bien la variabilidad entre las especies.

Se concluye que el descenso postnatal de los esteroides fecales reproductivos causado por la administración de un antagonista de GnRH no alteró el

crecimiento, la libido ni la fertilidad a la pubertad. No obstante, este tratamiento disminuyó la cantidad de folículos antrales y provocó un deterioro del epitelio germinal en hembras y machos, respectivamente. El efecto a largo plazo sobre fertilidad de este tratamiento podría ser adverso y justifica la continuación de su estudio.

Referencias

- Arnold E. Ovary and uterus. En: Slatter D. (Ed.). Textbook of Small Animal Surgery. 3ra ed. Ed Saunders RW, Philadelphia, 2002, p. 1496-98.
- Boothe H. Testes and Epididymies. Textbook of small animal surgery. En: Slatter, D (ed). Saunders RW, Philadelphia, USA, 2002, p. 1529.
- Bristol-Gould S, Woodruff T. Folliculogenesis in the domestic cat (Felis catus). <u>Theriogenology</u>. 2006; 66: 5-13.
- Brown J, Wakter S, Steinman K. Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non domestic species. Conservation and research center, Smithsonian's National Zoological Park Virginia, USA, 2004; p. 62.
- Carranza A, Faya M, Merlo M, Batista P, Gobello C. Effect of GnRH analogs in postnatal domestic cats. <u>Theriogenology</u>. 2014; 82: 138-143.
- Carrijo Jr O, Marinho A, Campos A, Amorim C, Báo S and Lucci C. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. <u>Cells Tissues Organs</u>. 2010; 191: 152-160.

- Chen Y, Li L, Chen X, Zhang Q, Wang W, Li Y, Yang D. Ovarian volume and follicle number in the diagnosis of polycystic ovary syndrome in Chinese women. <u>Ultrasound Obstet Gynecol</u>. 2008; 32: 700-3.
- Crews D, Willingham E, Skipper J. Endocrine disruptors: present issues, future directions. <u>Q Rev Biol</u>. 2000; 75: 243-260.
- Driancourt M. Follicular dynamics in sheep and cattle. <u>Theriogenology</u>. 1991; 35: 55-79.
- Erickson B. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. <u>J.</u> <u>Anim Sci</u>. 1966; 25: 800-805.
- 11. Faya M, Carranza A, Miotti R, Ponchón T, Furlan P, Gobello C. Fecal estradiol-17β and testosterone in prepubertal domestic cats. <u>Theriogenology</u>. 2013; 80: 584-586.
- Faya M, Marchetti C, Priotto M, Grisolía M, D'Francisco F, Gobello C.
 Postponement of canine puberty by neonatal administration of a long term release GnRH superagonist. <u>Theriogenology</u>. 2018; 118: 190-195.
- França L, Godinho C. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (Felis catus). <u>Biol Reprod</u>. 2003; 68: 1554-1561.
- Gobello C. Effects of GnRH Antagonists vs Agonists in Domestic Carnivores, a Review. <u>Reprod. Domest. Anim.</u> 2012; 47: 373-376.
- Gougeon A, Chainy G. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. <u>Reproduction</u>. 1987; 81: 433-442.

- Jivago J, Paulini F, Silva R, Araujo M, Marinho A, Lucci C. Cryopreservation and characterization of canine preantral follicles. <u>Cryobiology</u>. 2018; 81: 34-42.
- Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS. The feline estrous cycle. En: Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia, Saunders WB, 2001, p. 396-405.
- Kolho K, Nikula H, Huhtaniemi I. Sexual maturation of male rats treated postnatally with a gonadotrophin-releasing hormone antagonist. <u>J Endocrinol</u>. 1988; 116: 241-246.
- 19. Kolho K, Huhtaniemi I. Suppression of pituitary-testis function in rats treated neonatally with a gonadotrophin-releasing hormone agonist and antagonist: acute and long-term effects. <u>J Endocrinol</u>. 1989; 123: 83-91.
- 20. Land R. Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and Finnish Landrace cross Blackface and Welsh sheep. <u>Reproduction</u>. 1970; 21: 517-521.
- Lein D, Concannon P, Hodgson B. Reproductive behavior in the queen. <u>J Am</u> <u>Vet Med Assoc</u>. 1982; 181: 275.
- 22. Lucci C, Rumpf R, Figueiredo J, Báo S. Zebu (Bos indicus) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. <u>Theriogenology</u>. 2002; 57: 1467-1483.
- 23. Lunardon N, Silva-Santos K, Justino R, Dessunti G, Seneda M, Martins M. Population estimate of the preantral follicles and frequency of multioocyte follicles in prepubertal and adult bitches. <u>Theriogenology</u>. 2015; 83: 1015-1020.

- 24. Mann D, Fraser H. The neonatal period: a critical interval in male primate development. <u>J Endocrinol</u>. 1996; 149: 191-197.
- Mattoon J, Nyland T. Ovaries and Uterus. En Small Animal Diagnostic Ultrasound. Nyland, T., Mattoon, J. (eds.). Philadelphia, WB Saunders, 2002, p. 237-249.
- 26. Mehl N, Srisuwatanasagul S, Swangchan-Uthai T, Sirivaidyapong S, Khalid M. GnRH-agonist implants suppress reproductive function and affects ovarian LHR and FSHR expression in prepubertal female cats. <u>Theriogenology</u>. 2017; 87: 250-258.
- 27. Meijs-Roelofs H, Van Cappellen W, van Leeuwen E, Kramer P. Short-and long-term effects of an LHRH antagonist given during the prepubertal period on follicle dynamics in the rat. <u>J Endocrinol</u>. 1990; 124: 247-253.
- Mills J, Valli V, Lumsden J. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. <u>CanVet J</u>. 1979; 20: 95-101.
- 29. Muir T, Leach R, Roche P, Gaffey T, Kuehl T, Dukelow W, Ory S. GnRH antagonist effects on follicle number and size in rat neonates and infants. <u>Zool Sci</u>. 1999; 16: 299-302.
- 30. Pryor J, Hughes C, Foster W, Hales B, Robaire B. Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. <u>Environ Health Perspect</u>. 2000; 108: 491-503.
- Robertson S. A review of feral cat control. <u>J Feline Med Surg</u>. 2008; 10: 366-375.
- 32. Silva-Santos K, Santos G, Siloto L, Hertel M, Andrade E, Rubin M, Sturion L, Melo-Sterza F, Seneda M. Estimate of the population of preantral follicles in

the ovaries of Bos taurus indicus and Bos taurus taurus cattle. <u>Theriogenology</u>. 2011; 76: 1051-1057.

- 33. Suvarna S, Layuton C, Bancroft D. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th edition. New York, NY, USA, Churchill Livingstone Press, 2013.
- 34. Van Cappellen W, Meijs-Roelofs H, Kramer P, Van den Dungen H. Ovarian follicle dynamics in immature rats treated with a luteinizing hormonereleasing hormone antagonist (Org. 30276). <u>Biol Reprod.</u> 1989; 40: 1247-56.
- 35. Van den Dungen H, Van Dieten J, Tilders F, Van Rees G, Schoemaker J . Administration of a GnRH-antagonist to immature rats affects subsequent female and male pubertal development differently. <u>Eur J Endocrinol</u>. 1989; 120: 778-784.

CAPÍTULO II

EFECTO DEL ESTEROIDE, ENANTATO DE TESTOSTERONA EN FELINOS MACHOS POSTNATALES

Introducción

El efecto de los esteroides sexuales perinatales en la reproducción adulta se describió mayormente en mamíferos hembra tal como rata (Barraclough y Gorski, 1961; Pinilla y col., 1993; Mena y col., 1992); perra (Beach y col., 1983; Ponchón y col., 2016); ratón (Cooke y col., 2012); oveja (Spencer y Gray, 2006) y gata (Demaldé y col., 2016; López Merlo y col., 2016). En gatos hembra la administración postnatal suprafisiológica de andrógenos y progestágenos causaron anovulación (Demaldé y col., 2016) pero no previnieron la adenogénesis uterina (López Merlo y col., 2016), respectivamente.

Es sabido que los mamíferos machos requieren una exposición "preparatoria" a la testosterona (T) antes e inmediatamente después del nacimiento para tener un comportamiento y desarrollo reproductivo normal como adultos (Jean-Faucher y col., 1989). Así mismo, está claro que la exposición a andrógenos exógenos durante el período crítico postnatal del desarrollo puede resultar en una variedad de anormalidades del desarrollo y funcionales reproductivas. Específicamente, la androgenización neonatal en ratas produjo disminución de peso de próstata, vesículas seminales (Piacsek y Hostetter, 1984) y testículos (Moguilevsky y col., 1977) cuando estos animales alcanzaron la madurez sexual. También se describieron alteraciones en las enzimas testiculares involucradas en la esteroidogénesis en ratas androgenizadas neonatalmente (Joseph y Kincl, 1974; Barañao y col., 1981). En cerdos la administración neonatal temprana de andrógenos no sólo redujo T sérica sino también el tamaño de los túbulos seminíferos y el peso testicular (Ventanas y col., 1992). Además, la exposición neonatal tanto de T (Diamond y col., 1973) o progesterona (Hull, 1981) redujo el comportamiento sexual de ratas macho.

A pesar de que la búsqueda de alternativas prácticas y seguras para el control de la sobrepoblación felina es prioridad nacional e internacional, la contracepción masculina ha sido pobremente explorada (Kogan y Wald, 2014). Además, si los gatos machos se volvieran estériles de forma permanente o transitoria, la salud reproductiva de la hembra podría preservarse, ya que no serían necesarios tratamientos hormonales en este género (Munson y col., 2006).

Si bien la administración postnatal de andrógenos sexuales podría representar una opción contraceptiva o esterilizante en machos, a nuestro conocimiento, no existen estudios que evalúen estas hormonas para ese propósito. Para probar la hipótesis de que la administración de andrógenos, durante la ventana crítica postnatal, induce un deterioro en la función reproductiva en el gato macho, este estudio describe los efectos físicos, hormonales e histológicos de una dosis única y alta del andrógeno de liberación lenta, enantato de testosterona, en la reproducción de gato doméstico. Secundariamente también se evaluó la seguridad clínica del protocolo farmacológico propuesto.

Materiales y métodos

Animales

En el presente estudio se incluyeron ocho gatos machos recién nacidos pertenecientes a la Colonia experimental felina de la Universidad Nacional de La Plata. Al nacimiento los animales fueron sexados de acuerdo a la distancia anogenital e identificados. Los felinos fueron criados sueltos en una habitación de 5 x 5 m, enriquecida y con 14 horas de luz por día. Al ser destetados a los 40 días de vida se alimentaron con balanceado comercial *premiun* para cachorros y agua *ad libitum.* Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité institucional de cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de La Plata y el experimento fue conducido según las normas establecidas por *"The guide of The Care and Use of Laboratory Animals"*, USA.

Protocolos farmacológicos

Los felinos de la misma camada fueron aleatoriamente asignados a uno de los siguientes grupos de tratamientos dentro de las 24 horas de vida:

 Enantato de testosterona (Testoviron Depot 250, Bayer, Argentina) 12.5 mg dosis única, subcutáneo (ET; n=4)

- Placebo: solución fisiológica subcutáneo (PL; n=4)

Las dosis fueron seleccionadas de acuerdo a publicaciones previas (Demaldé y col., 2016) y pruebas piloto previas en gatos basadas en Barraclough y Gorski (1961).

Seguimiento

Los animales se examinaron físicamente incluyendo peso corporal (kg), la altura a la cruz (cm), la longitud corporal (cm), la separación balanoprepucial, y la aparición de espículas peneanas una vez a la semana. También, el comportamiento de los gatos se observó por al menos 1,5 horas al día. El seguimiento físico y comportamental sexual se extendió hasta la pubertad, la que se definió como la separación completa balanoprepucial y la presencia de espículas peneanas (van den Dungen y col., 1989). A la pubertad los animales se sometieron a pruebas de fertilidad *in vivo*.

Recolección de materia fecal, extracción y determinaciones hormonales

Las muestras fecales se recolectaron y refrigeraron semanalmente durante el primer mes y luego en las semanas 7 y 10 para la determinación de T (ng/g). Para este propósito, cada gato fue confinado individualmente en una jaula con bandejas sanitarias limpias durante una noche. Durante las primeras 4 semanas de vida, los cachorros fueron estimulados con supositorios de glicerina pediátricos a fin de obtener las muestras. La T se extrajo usando el método descripto por Brown y col. (2004) y luego determinado mediante inmunoensayo de

electroquimioluminiscencia (Elecsys Testo II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Los coeficientes de variación inter e intraensayo fueron menores al 10% y la sensibilidad fue de 0.025ng/ml. Todos los datos fecales fueron expresados en base a peso húmedo (Faya y col., 2013).

Prueba de fertilidad in vivo

Cuando los machos alcanzaron la pubertad fueron expuestos a una hembra de fertilidad probada de la colonia durante un periodo de estro completo. Se verificaron los apareamientos por observación de los mismos y/o detección de espermatozoides en citologías vaginales de las hembras. A los 21 días de comenzado el estro se realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonografía bidimensional en todas las hembras (Mattoon y Nyland, 2002).

Orquiectomías

Luego de la prueba de fertilidad todos los gatos fueron orquiectomizados (Boothe, 2002). Para este procedimiento se realizó una premedicación con sulfato de atropina (Sulfato de atropina, John Martin; 0,04mg/kg, im), maleato de acepromacina (Acedan, Holliday; 0,03mg/kg, im), y butorfanol (TorbutolPlus, Fort Dodge; 0,2mg/kg, im). La anestesia se indujo con propofol (Propovet, Richmond; 5mg/kg, iv). En todos los casos, se procedió a la intubación endotraqueal y para el mantenimiento se utilizó un circuito cerrado de anestesia inhalatoria con isofluorano. La medicación postquirúrgica se basó en meloxicam

(Meloxivet, John Martin; 0,1mg/kg) y antibioticoterapia, administrados vía subcutánea por única vez y se continuó oralmente los días posteriores. Inmediatamente después de la recuperación todos los felinos fueron ofrecidos en adopción responsable.

Examen macroscópico e histológico testicular

Inmediatamente después de la remoción quirúrgica, los testículos fueron medidos (ancho, largo y profundidad; cm) usando un calibre Vernier y pesados (g). Además, se calculó el volumen gonadal (V= LxW²x0,52; L= largo; W= ancho, cm³; Lin y col., 2009) y el índice gonadosomático (%; França y Godinho, 2003).

Los espermatozoides se obtuvieron por el método de flotación con incisiones cada 2 mm de la cola del epidídimo de cada testículo la que se dejó flotar en una placa de laboratorio con 2,5 ml de un diluyente comercial de semen a 37°C durante 10 minutos. La presencia de motilidad espermática se evaluó con un aumento 400x. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 1400 g/min durante 8 minutos para facilitar la remoción de la mayor parte del sobrenadante y se evaluó la morfología espermática con tinción de Giemsa bajo un aumento de 1000x en microscopio de luz (Valiente y col., 2014).

Los testículos fueron seccionados longitudinalmente, colocados en fijador de Bouin durante 24 horas y luego cambiado a alcohol 70% hasta el proceso rutinario de inclusión en parafina. Luego de procesar, se realizaron secciones seriadas de 5 µm que fueron montados en portaobjetos, secados, desparafinados con xilol, rehidratados en soluciones graduadas de etanol y teñidos con hematoxilina eosina (Suvarna y col., 2013).

Las imágenes histológicas se obtuvieron de un microscopio (Olympus BX50, Tokyo, Japan; 10X o 40X) conectado a una videocámara digital RGB (Evolution VF Color, Q Imaging, EE. UU.) y digitalizadas en formato TIFF color 24 bit. En treinta perfiles tubulares redondos se evaluaron el diámetro tubular medio (µm), la altura media del epitelio germinal (µm) así como cantidad media de cada componente celular, es decir, espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios, espermátides redondas, espermátides elongadas, espermatozoides y células de Sértoli. También se registró el número de células de Leydig en 20 espacios intertubulares completos, y se midió el área de sus núcleos (µm²). Se calculó la relación túbulo/intersticio y espermátide/Sértoli como índice de eficiencia de la espermatogénesis (Russell y Peterson, 1984). Las imágenes fueron analizadas a través de planimetría (Image Pro Plus v6.0-Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).

Análisis estadístico

La normalidad de distribución de los resultados se probó usando el test de normalidad de Shapiro-Wilk. Las concentraciones de T fecal en los diferentes tratamientos (ET vs. PL) fueron comparadas a lo largo de las semanas por ANOVA de medidas repetidas seguido por test post hoc de Tukey. La preñez se comparó en ambos grupos por medio de la prueba de Fisher. Los parámetros físicos e histológicos entre los diferentes grupos de tratamientos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido por el test post hoc de Tukey. En todos los casos los datos se expresaron como la media \pm SEM. El nivel de significancia se fijó en P < 0,05 (SPSS 17.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

Resultados

Pubertad y parámetros físicos

La edad a la pubertad de los gatos fue similar entre los grupos ET y PL (190,4 \pm 24,2 vs. 221,7 \pm 23,7 días; respectivamente, P > 0,05). La altura a la cruz (24,25 \pm 0,63 vs. 23,75 \pm 0,63 cm; respectivamente, P > 0,1; **Figura 1**), la longitud corporal (29,5 \pm 0,87 vs. 28,2 \pm 0,63 cm; respectivamente, P > 0,1; **Figura 2**) y el peso corporal (2,48 \pm 0,25 vs. 2,71 \pm 1,81 kg, P > 0,1; respectivamente, **Figura 3**) a la pubertad tampoco se diferenciaron entre los mismos grupos. Ninguno de los animales presentó efectos clínicos secundarios ni alteraciones conductuales a lo largo del período de estudio. **Figura 1**: Altura a la cruz (media \pm SEM) desde el nacimiento hasta la pubertad de machos tratados postnatalmente con enantato de testosterona (ET; n= 4) o placebo (PL; n=4). No se hallaron diferencias entre los grupos (P>0,1). Los gatos TE fueron representados con círculos negros y los gatos PL con círculos blancos.



Figura 2: Largo corporal (media \pm SEM) desde el nacimiento hasta la pubertad de los machos de la Figura 1. Los gatos TE fueron representados con círculos negros y los gatos PL con círculos blancos.



Figura 3: Peso corporal (media±SEM) desde el nacimiento hasta la pubertad de los machos de la Figura 1. No se hallaron diferencias entre los grupos (P>0,1). Los gatos TE fueron representados con círculos negros y los gatos PL con círculos blancos.



Concentraciones hormonales

La concentración de T fecal fue más alta en el grupo TE durante las primeras 4 semanas postnatales (P < 0,05). Desde la séptima semana y hasta finalizado el periodo de seguimiento ambos grupos presentaron concentraciones basales (P > 0,05; **Figura 4**).

Figura 4: Concentración de testosterona fecal (T; media \pm SEM) desde el nacimiento hasta la décima semana de vida, de los machos de la Figura 1. Los asteriscos representan diferencias (P<0.05). Los gatos TE se representaron con círculos negros y los gatos PL con círculos blancos.



Examen macroscópico e histológico de las gónadas

Los parámetros testiculares macroscópicos que incluyeron el peso, volumen e índice gonadosomático no difírieron entre los grupos (P> 0,1; **Tabla 1**). La evaluación microscópica reveló que todos los gatos presentaron escasos espermatozoides epididimales y que éstos tenían morfología y motilidad normal sin diferencias entre los grupos (P> 0,1).

A pesar de que en los gatos del grupo ET se apreció vacuolización del epitelio seminífero y un borde luminal del epitelio algo "deshilachado" no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los elementos celulares. Por otro lado, se observó un incremento de la luz tubular y de los detritos luminares y una menor área nuclear de las células de Leydig en el grupo ET (**Tabla 2; Figura 5**).

Tabla 1: Parámetros testiculares morfométricos (media \pm SEM) a la pubertad de los gatos de la Figura 1. No se encontraron diferencias (P > 0,1) entre los tratamientos en ninguno de los casos.

Parámetro	Enantato de testosterona	Placebo
Peso testicular (g)	2,65±0,10	2,85±0,16
Volumen testicular (cm ³)	1,75±0,56	1,33±0,65
Indice gonadosomático (%)) 0,11±0,00	0,11±0,00

Tabla 2: Parámetros histológicos (media±SEM) de los gatos de la Figura 1. Los mismos superíndices en una misma línea indican (P>0,05) entre grupos.

Parámetro	Enantato de testosterona	Placebo
Diámetro tubular (µm)	196,93±1,76ª	194,54±2,97ª
Altura del epitelio germinal (µm)	40,74±0,91 ^a	38,35±1,28 ^a
Área de luz tubular (µm)	5018.89±207,40 ^a	4564.56±252,33 ^b
Detritus celular (µm)	567.63±100,38ª	111.98±18,55 ^b
Espermatogonia/túbulo	2,43±0,16 ^a	2,18±0,19 ^a
Espermatocito primario/túbulo	78,65±1,88ª	67,68±2,70 ^a
Espermatocito secundario/túbulo	$0,00{\pm}0,00^{a}$	0,01±0,01ª
Espermátide redonda/túbulo	50,28±3,26ª	49,27±4,17 ^a
Espermátide elongada/túbulo	17,57±2,22 ^a	11,94±2,34 ^a
Espermatozoide/túbulo	33,79±2,46ª	28,56±2,92ª
Célula de Sértoli/túbulo	23,74±0,46 ^a	23,91±0,58ª

3,33±0,28 ^a	2,89±0,32ª
0,26±0,04 ^a	0,14±0,04 ^a
5,63±0,27 ^a	5,14±0,25 ^a
0,10±0,00 ^a	0,080±0,00 ^b
24.33±0,43ª	30.15±0,42 ^b
	$3,33\pm0,28^{a}$ $0,26\pm0,04^{a}$ $5,63\pm0,27^{a}$ $0,10\pm0,00^{a}$ $24.33\pm0,43^{a}$

Figura 5: Tejido testicular representativo de los gatos de la Figura 1. (A) ET: Epitelio seminífero con pequeñas vacuolas, bordes irregulares y presencia de detritus celular en la luz. (B) PL: Epitelio germinal normal.





Pruebas de fertilidad in vivo

Todos los machos realizaron varios servicios y todas las hembras quedaron preñadas sin diferencias entre tratamientos (P > 0,1).

Discusión

A nuestro conocimiento, este es el primer reporte sobre de la administración postnatal de un andrógeno, el enantato de testosterona, en gatos machos con fines contraceptivos. Como se esperaba, en el grupo ET, el ensayo hormonal evidenció principalmente que la administración postnatal exógena de T de liberación lenta causó una concentración suprafisiológica durante las primeras cuatro semanas postnatales. Así, la secreción de T endógena muy probablemente se suprimió. En este estudio la edad y el crecimiento corporal a la pubertad fueron normales (Feldman y Nelson, 2004) para la especie y no se afectaron por los tratamientos. Estos hallazgos físicos coinciden con lo descripto previamente en hembras carnívoras tratadas postnatalmente con andrógenos o progestágenos (Demaldé y col., 2016; Ponchón y col., 2016; López Merlo y col., 2016) y también en cerdos machos tratados postnatalmente con acetato de medroxiprogesterona (Clark y col., 2012).

A diferencia de trabajos en cerdos (Clark y col., 2012; Ventanas y col., 1992) y ratones (Jean-Faucher y col., 1984, 1985) tratados postnatalmente con progestágenos o andrógenos, y ratas tratadas con testosterona (Frick y col., 1969) donde se observó disminución de peso y volumen testicular, en el presente estudio no se encontraron diferencias para ninguno de los parámetros macroscópicos testiculares. Estas diferencias entre los estudios podrían estar dadas por las características propias de la especie, dosis administrada y tipo de esteroide aplicado.

La ausencia de otros efectos secundarios clínicos en este estudio coincide con reportes previos que usaron el mismo protocolo en hembras domésticas (Demaldé y col., 2016; Ponchón y col., 2016; López Merlo y col., 2016). Por otro lado, la seguridad de esos tratamientos debería ser evaluada a largo plazo.

En los estudios microscópicos testiculares, las vacuolas tubulares encontradas en las gónadas TE suelen representar un proceso adverso del parénquima testicular (Vidal y Whitney, 2014). No obstante, la implicancia de estas vacuolas en estos animales se desconoce ya que no se hallaron otras diferencias a excepción del aumento de la luz tubular y el detritus luminar en este mismo grupo. La disminución del área nuclear de las células de Leydig en el grupo TE podría evidenciar el efecto de la retroalimentación negativa del eje gonadal en el grupo tratado con andrógenos.

Se puede postular que, en los neonatos felinos, al igual que en otros mamíferos machos, se requieren concentraciones fisiológicas de andrógenos para el desarrollo testicular normal, y que concentraciones altas tempranas de T producen alteraciones en la histología testicular. Así en los animales tratados neonatalmente con T de este estudio, el área ocupada por túbulos seminíferos fue significativamente menor y la luz tubular mayor que en los animales controles. Similarmente, cuando se administró neonatalmente propionato de testosterona a ratas machos se observó una disminución de diámetro tubular, arresto espermatogénico y atrofía testicular (Almirón, 1984).

Se concluye que la administración de andrógenos posnatales en felinos produjo deterioro histológico testicular. No obstante, se requieren más estudios reproductivos incluyendo efectos secundarios a largo plazo antes de que estos protocolos puedan ser utilizada con fines contraceptivos en la práctica diaria.

Referencias

1. Almirón I, Domené H, Chemes HE. The hormonal regulation of premeiotic steps of spermatogenesis in the newborn rat. <u>J Androl</u>. 1984; 5: 235-242.

2. Barañao JL, Chemes H, Tesone M, Chiauzzi VA, Scacchi P, Calvo JC, Faigon MR, Moguilevsky JA, Charreau EH, Calandra RS. Effects of androgen treatment of the neonate on rat testis and sex accessory organs. <u>Biol Reprod</u>. 1981; 25: 851-858.

3. Barraclough CA, Gorski RA. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. <u>Endocrinology</u>. 1961; 68: 68-79.

4. Beach FA, Buehler MG, Dunbar IF. Sexual cycles in female dogs treated with androgen during development. <u>Behav Neural Biol</u>. 1983; 38: 1-31.

5. Boothe H. Testes and Epididymies. Textbook of small animal surgery. En: Slatter, D (ed). Philadelphia, USA, Saunders RW, 2002, p. 1529.

6. Brown J, Wakter S, Steinman K. Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non-domestic species. Conservation and research center, Smithsonian's National Zoological Park Virginia, USA, 2004, p. 62.

7. Clark SG, Cecere TE, Krisher RL. Effects of a depot progestin on spermatogenesis in postnatal pigs. <u>Clin Theriogenology</u>. 2012; 4: 399.
8. Cooke P, Ekman G, Kaur J, Davila J, Bagchi I, Clark S, Dziuk P, Hayashi K, Bartol FF. Brief exposure to progesterone during a critical neonatal window prevents uterine gland formation in mice. <u>Biol Reprod.</u> 2012; 86: 63.

9. Demaldé L, Merlo M, Vercellini R, Barbeito C, Fernandez P, Gobello C. Disrupting effect of androgens in postnatal female domestic cats. <u>Anim Reprod</u> <u>Sci</u>. 2014; 171: 65-71.

10. Diamond M, Llacuna A, Wong CL. Sex behavior after neonatal progesterone, testosterone, estrogen, or antiandrogens. <u>Horm Behav</u>. 1973; 4: 73-88.

11. Faya M, Carranza A, Miotti R, Ponchón T, Furlan P, Gobello C. Fecal estradiol-17 β and testosterone in prepubertal domestic cats. <u>Theriogenology</u>. 2013; 80: 584–586.

12. Feldman EC, Nelson RW. Feline reproduction. En: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 3era. Edición. St. Louis, Missouri, USA, Ed.WB Saunders Co, 2004, p. 1016-1045.

13. Frick J, Chang CC, Kincl FA. Testosterone plasma levels in adult male rats injected neonatally with estradiol benzoate or testosterone propionate. <u>Steroids</u>. 1969; 13: 21-27.

14. França L, Godinho C. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (Felis catus). <u>Biol Reprod</u>.
2003; 68: 1554–1561.

15. Hull EM. Effects of neonatal exposure to progesterone on sexual behavior of male and female rats. <u>Physiol Behav</u>. 1981; 26: 401-405.

16. Jean-Faucher C, Berger M, De Turckheim M, Veyssiere G, Jean C. Sexual maturation in male mice treated with cyproterone acetate from birth to puberty. J Endocrinol. 1984; 102: 103-107.

17. Jean-Faucher C, Berger M, De Turckheim M, Veyssiere G, Jean C. Permanent changes in the functional development of accessory sex organs and in fertility in male mice after neonatal exposure to cyproterone acetate. <u>J Endocrinol</u>. 1985; 104: 113-120.

18. Jean-Faucher C, Berger M, Gallon C, de Turckheim M, Veyssiere G, Jean C. Long-term alterations on the male mouse genital tract associated with neonatal exposure to cyproterone acetate biochemical data. <u>J Steroid Biochem</u>. 1989; 32: 105-112.

19. Joseph AA, Kincl FA. Neonatal sterilization of rodents with steroid hormones: 5. A note on the influence of neonatal treatment with estradiol benzoate or testosterone propionate on steroid metabolism in the brain and testes of adult male rats. J Steroid Biochem. 1974; 5: 227-231.

20. Kogan P, Wald M. Male contraception: history and development. <u>Urol Clin</u>.2014; 41: 145-161.

21. Mattoon J, Nyland T. Ovaries and Uterus. En Small Animal Diagnostic Ultrasound. Nyland, T., Mattoon, J. (eds.). Philadelphia, WB Saunders, 2002, p. 237-249.

22. Mena MA, Arriaza CA, Tchernitchin AN. Early postnatal androgenization imprints selective changes in the action of estrogens in the rat uterus. <u>Biol Reprod.</u> 1992; 46: 1080-5.

23. Moguilevsky JA, Scacchi P, Szwarcfarb B. Effect of estrogens on LH- and FSH levels in prepuberal male and female androgenized rats. <u>Experientia</u> 1977;
33: 1533-4.

24. Munson, L. Contraception in felids. Theriogenology. 2006; 66: 126-134.

25. Piacsek BE, Hostetter MW. Neonatal androgenization in the male rat: evidence for central and peripheral defects. <u>Biol Reprod.</u> 1984; 30: 344-51.

26. Pinilla L, Trimino E, Garnelo P, Bellido C, Aguilar R, Gaytan F, Aguilar E. Changes in pituitary secretion during the early postnatal period and anovulatory syndrome induced by neonatal oestrogen or androgen in rats. <u>J Reprod Fertil</u>. 1993; 97: 13-20.

27. Ponchon T, Lopez Merlo M, Faya M, Priotto M, Barbeito C, Gobello C.
Postnatal exposure to a progestin does not prevent adenogenesis in domestic dogs.
<u>J Vet Sci</u>. 2016;17 :111-3.

28. Russell LD, Peterson RN. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. <u>J Reprod Fertil</u>. 1984; 70: 635-64.

29. Spencer TE, Gray CA. Sheep uterine gland knockout (UGKO) model. <u>Methods Mol Med.</u> 2006; 121: 85-94.

30. Suvarna S, Layuton C, Bancroft D. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th edition. New York, NY, USA, Churchill Livingstone Press, 2013.

31. Valiente C, Arauz S, De la Sota P, Gobello C. Ejaculation training, seminal alkaline phosphatase and preservation through cooling in a milk-based extender in domestic cats. J Feline Med Surg. 2014; 16: 312-6.

32. Van den Dungen H, Van Dieten J, Tilders F, Van Rees G, Schoemaker J.
Administration of a GnRH-antagonist to immature rats affects subsequent female and male pubertal development differently. <u>Eur J Endocrinol</u>. 1989; 120: 778-784.
33. Ventanas J, Lopez-Bote CJ, García C. Further signs of postnatal sexual

differentiation in pigs. <u>Exp Clin Endocrinol</u>. 1992; 99: 119-22.

34. Vidal JD, Whitney KM. Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity. <u>Spermatogenesis</u>. 2014; 3: 979099.

CONCLUSIONES FINALES

- La administración postnatal durante 2 semanas con dosis altas del potente antagonista de GnRH, acyline, disminuyó la concentración de los esteroides sexuales fecales en las primeras semanas de vida en el gato doméstico.
- La administración postnatal de este antagonista de GnRH y de andrógenos no alteraron el crecimiento, la libido ni la fertilidad al momento de la pubertad.
- El acyline postnatal disminuyó la cantidad de folículos antrales y provocó un deterioro del epitelio germinal en hembras y machos, respectivamente.
- La administración postnatal de testosterona aumentó el área de luz de túbulos seminíferos testiculares y disminuyó la del área nuclear de células de Leydig.
- Ninguno de los felinos sometidos a estos tratamientos con acyline y testosterona postnatales presentó efectos clínicos secundarios, excepto un gato tratado con acyline que presentó criptorquidismo inguinal unilateral.
- Quedan por estudiar los efectos a largo plazo reproductivos así como también sus eventuales efectos adversos de estos tratamientos esteroides y no esteroides postnatales.

PUBLICACIONES



Acta Veterinaria Hungarica

DOI: 10.1556/004.2021.00052 © 2021 Akadémiai Kiadó, Budapest

Testicular effects of a postnatal GnRH antagonist in domestic cats

MARIELA GRISOLIA-ROMERO^{1,2*} , MARCELA FAYA^{3,2}, CYNTHIA MARCHETTI^{1,2}, HANNA KÖRBER⁴, SANDRA GOERICKE-PESCH⁴ and CRISTINA GOBELLO^{1,2}

¹ Faculty of Veterinary Sciences, National University of La Plata, Argentina

² National Research Council, Argentina

³ Catholic University of Cordoba, Argentina

⁴ Reproductive Unit of the Clinic - Clinic for Small Animals, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Hannover, Germany

Received: 12 April 2021 • Accepted: 16 November 2021

RESEARCH ARTICLE



ABSTRACT

The aim of this study was to describe the histological effects of two high postnatal doses of the potent third-generation GnRH antagonist, acyline in the domestic cat testicle. Secondly, the physical, endocrine, and steroidogenic findings of this pharmaceutical protocol are also reported. Twelve postnatal littermate male kittens were administered acyline in a dose of 2.2 mg/100 g SC weekly for 2 weeks (ACY; n = 6), or placebo (PL; n = 6). All the animals were followed up until puberty when they were castrated. Serial faecal samples were collected until the age of 10 weeks for testosterone (T) measurement. The kittens achieved puberty without either age (236.5 ± 19.7 vs. 221.7 ± 23.7 days) or body weight (3.05 ± 0.15 vs. 2.78 ± 0.28 kg, P > 0.05) differences between ACY and PL, respectively. Acyline suppressed faecal T concentrations for 3 weeks (P < 0.01). From the fourth week on, both groups had low concentrations up to the end of the follow-up period (P > 0.05). Histological assessment of the testes showed that ACY cats presented a reduced height of the epithelium (P < 0.01) due to the diminished number of germinal cells accompanied by an enlarged luminal area (P < 0.01) with cellular debris (P < 0.01). The immunostaining of P450c17 also appeared partially diminished in ACY testes.

KEYWORDS

feline, testicle, contraception, GnRH analogue, gonad

INTRODUCTION

Domestic cats are highly efficient at reproduction, and feline overpopulation has become a serious problem in many cities all over the world. Surgical methods are one of the first choices as a tool for population control. However, surgery is expensive and labour intensive for stray animals (Mehl et al., 2017). Other permanent alternatives to surgical sterilisation (i.e., hormonal, immunologic, chemical, and so forth) are being investigated including postnatal endocrine disruption (Faya et al., 2013; Carranza et al., 2015). In this respect, it should be known that in mammals the pituitary–gonadal function during the postnatal period is essential for normal sexual maturation and for the proper development of adult sexual functions (Kolho and Huhtaniemi, 1989). Thus, the early neonatal period is a well-recognised period of reproductive vulnerability in most mammals (Mann and Fraser, 1996; Pryor et al., 2000). Postnatal gonads are very active in cats. Thus, birth is followed by the presence of elevated faecal sexual steroids which are followed by low 'infantile' concentrations after the first postnatal weeks (Faya et al., 2013).

*Corresponding author. Tel.: +54-351-153986904. E-mail: mgrisolia89@gmail.com



GnRH analogues, which include agonists and antagonists, have been produced by amino acid substitutions within the native GnRH molecule, resulting in greater potency and a longer duration of effectiveness. Differently to GnRH agonists, antagonists competitively block and inhibit GnRH-induced GnRH receptor gene expression leading to an immediate, dose-dependent, pituitary suppression (Gobello, 2012). Neonatal administration of GnRH agonists and antagonists has delayed puberty in domestic cats and laboratory rodents, respectively (Carranza et al., 2014; Kolho et al., 1988). When the potent third-generation GnRH antagonist acyline (33 µg/100 g) was administered postnatally for 3 months, it diminished faecal testosterone (T) concentrations during the first postnatal weeks but this antagonist did not cause low 'infantile' concentrations (Carranza et al., 2014). Therefore, higher postnatal doses seemed to be necessary to deprive the cats of the physiological postnatal androgen effect.

Cytochrome P450 side chain cleavage (P450scc) is a mitochondrial enzyme that catalyses the conversion of cholesterol to pregnenolone, the first reaction in the process of steroidogenesis. Cytochrome P450 17α -hydroxylase (P450c17) is a key enzyme in the androgenic pathway. Both P450scc and P450c17 are expressed in Leydig cells of the testes (Heinrich and De Falco, 2020).

Furthermore, the histological and steroidogenic effects of a postnatal GnRH antagonist on pubertal male gonads have not been investigated in this species. Thus, the aim of this study was to describe the histological effects of high doses of the potent third-generation GnRH antagonist acyline in the domestic cat testicle. Secondly, the physical, endocrine, and steroidogenic findings of this pharmaceutical protocol are also reported.

MATERIALS AND METHODS

Animals and pharmacological protocols

Twelve (5 litters) newborn littermate male kittens from the National University of La Plata institutional cat colony were included in this study. The animals were sexed according to anogenital distance and identified at birth, reared under 14 h of light per day, weaned at the age of 40 days and fed a premium commercial kitten food and water ad libitum. This study was reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee of the Veterinary School of the National University of La Plata, and all experiments were conducted under the guidelines established in The Guide for The Care and Use of Laboratory Animals, USA. The kittens of the same litters were randomly assigned to one of the following treatment groups within the first 24 h of birth: acyline (Contraception & Reproductive Health Branch Center for Population Research, NIH, Bethesda, MD, USA) 2.2 mg/100 g SC weekly for 2 weeks [ACY]; n = 6), or placebo (sterile distilled water, PL; n = 6). Acyline [acetyl-D2Nal-D4CIPhe-D3PalSer-Aph(ac)-DAph(Ac)-Leu-Lys(lpr)-Pro-D-Ala-Nh2] was provided as a lyophilised powder which was suspended in sterile

distilled water to a final concentration of 2 mg mL^{-1} . The dose was selected on the basis of pilot trials in cats.

Follow-up

All the animals were followed up until puberty occurred. The felids were observed twice daily, looking for their behaviour. The cats were also physically examined including body weight (kg), balano-preputial separation, and penile spines once a week. Puberty was defined as complete balano-preputial separation and the appearance of penile spines (Carranza et al., 2014). The cats were castrated immediately after puberty was attained (Boothe, 1993) and placed for adoption.

Faecal sample collection, extraction and hormone determinations

Faecal samples were collected and frozen weekly during the first month and then in weeks 7 and 10 for T analysis (ng g⁻¹). During the first 4 weeks of age, the neonates had to be rectally stimulated by a thin plastic suppository attached to a string to obtain the sample. Then, each cat was confined in an individual cage with clean sanitary litter during one night. Testosterone was extracted using the methods described by Brown et al. (2008) and, then, determined using electrochemiluminescence immunoassays (Elecsys Testo II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Inter- and intra-assay coefficients of variation of the assays were <10% and sensitivity was 0.025 ng mL⁻¹. All faecal data were expressed on a wet-weight basis (Faya et al., 2013).

Gross, seminal and histological examination of the testes

Immediately after surgery, the testes were measured (length, width and depth; cm) using a Vernier calliper and weighed (g). Gonadal volume (cm³; Lin et al., 2009) and gonadosomatic index (%; França and Godinho, 2003) were also calculated.

Spermatozoa were obtained by manual slicing of the cauda epididymides. The presence of sperm progressive motility was subjectively assessed at × 400 magnification on a warmed glass slide. Then, the samples were centrifuged at 4 °C for 1,400 g for 8 min. The supernatant was removed and an aliquot of the sperm pellet was used to perform a smear for evaluation of spermatozoa morphology following Giemsa staining at \times 1,000 magnification using bright field microscopy (Valiente et al., 2014). One testis was sectioned longitudinally, placed in Bouin's fixative for 24 h and then changed to alcohol 70% and processed routinely with paraffin embedding. After processing, 5-µm serial sections were cut, mounted on slides, dried, deparaffinised in xylene, rehydrated in graded ethanol solutions and stained with haematoxylin and eosin (Bancroft et al., 1990). Histological images were obtained from a microscope (Olympus BX50, Tokyo, Japan; $10 \times$ or $40 \times$ through an attached digital RGB video camera (Evolution VF Colour, Q Imaging, USA) and digitalised in a 24 bit true colour TIFF format. Thirty round tubular profiles per testis were evaluated for mean tubular diameter (μ m), mean germinal epithelium height (μ m) as well as the mean number of each cellular component, i.e. spermatogonia, primary and secondary spermatocytes, round spermatids, elongated spermatids, spermatozoa and Sertoli cells. The number of Leydig cells in 20 complete intertubular spaces was recorded and their nucleus areas (μ m²) measured. The number of spermatids per Sertoli cell was also calculated. Images were analysed by planimetry (Image Pro Plus v6.0-Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).

Immunohistochemistry

Sections from Bouin-fixed paraffin blocks were deparaffinised and antigens were demasked by pretreatment with citrate buffer (pH = 6). Endogenous peroxidase activity was inhibited using 3% hydrogen peroxide in methanol. Goat serum (10%) and bovine serum albumin (BSA, 3%) in phosphate-buffered saline (PBS) buffer was used to block unspecific binding sites followed by incubation with the primary antibodies diluted in PBS with 3% BSA over night at 4 °C. Antibodies used were a rabbit polyclonal anti-rat antibody against cytochrome P450 side chain cleavage (P450scc), (dilution 1:200; US Biological, distributed by Biomol, Hamburg, Germany; Roby et al., 1991; Gentil et al., 2012) and a rabbit polyclonal antibody against recombinant bovine cytochrome P450 17α -hydroxylase (P450c17) (dilution 1:500; provided by Prof. A. J. Conley, Davis, USA; Peterson et al., 2001; Gentil et al., 2012). On the second day, the samples were first incubated with a Polymer-Enhancer (SuperVision-2 HRP Enhancer, DCS Innovative Diagnostic-System, Hamburg, Germany) followed by incubation with the HRP-polymer-reagent (SuperVision-2 HRP-Polymer, DCS Innovative Diagnostic-System). Each step of the immunohistochemistry was followed by a washing step with PBST (PBS containing 0.2% Tween 20) buffer $(2 \times)$ and PBS buffer $(1 \times)$. Immunopositive signals were visualised with DAB (DAB 2-komponenten kit, DCS ChromoLine, DCS Innovative Diagnostic-System) according to the manufacturer's protocol. Negative controls were set up using PBS buffer and irrelevant isotype controls (I-1000, Rabbit IgG, Control Antibody, Vector Laboratories) in the respective dilution instead of the primary antibodies. In the last steps, samples were washed, dehydrated in ascending alcohol dilutions and mounted with Eukitt[®] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany). Evaluation of the immunohistochemistry was performed using computer-assisted image analysis with GIMP 2.8 (https://www.gimp.org/) and ImageJ FIJI win-64 (https://imagej.net/Fiji) to quantify the percentage of the immunopositive area (PIA) and the staining intensity (mean grayscale; MGS) of the interstitial tissue as described before (Körber and Goericke-Pesch, 2019a). The MGS and PIA of the interstitial tissue were assessed in twenty randomly selected images at 200-fold magnification per sample. To allow the analysis of the interstitial tissue, the seminiferous tubules, blood vessels and artefacts were cropped. Then, the images were transferred into grayscale pictures and an individual threshold was chosen subjectively for each antibody. Positive signals above the threshold were used for the determination of the staining intensity (MGS). For the grayscale, 0 was defined as white and 255 as black. The PIA was assessed using the binarised grayscale image in which the black area represents the immunopositive stained area (Gentil et al., 2012; Körber and Goericke-Pesch, 2019a, b).

Statistical analysis

Normality of the distribution of results was tested using a Shapiro–Wilk normality test. Faecal T concentrations in the different treatments (ACY vs. PL) were compared throughout the weeks by repeated-measures ANOVA followed by Tukey's comparison *post hoc* test. Physical, histological and immunohistochemical differences in the treatment group were analysed by Student's *t*-test. Results were expressed as mean \pm SEM. A *P* < 0.05 was considered to be significant (Microsoft Excel; Windows XP; Microsoft and Graph Pad Prism7 software; GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA).

RESULTS

The kittens achieved puberty without differences between groups (236.5 \pm 19.7 vs. 221.7 \pm 23.7 days for ACY and PL, respectively; *P* > 0.05). Body weight (3.05 \pm 0.15 vs. 2.78 \pm 0.28 kg, *P* > 0.05) did not differ between the treatments either. One ACY cat presented unilateral inguinal cryptorchidism. None of the other cats presented clinical side effects (*P* > 0.05) nor behavioural alterations throughout the study period. Gross testicular parameters including weight, volume as well as the gonadosomatic index also did not vary between the groups (*P* > 0.05, Table 1).

Faecal T concentration differed between treatments during the first 3 postnatal weeks (P < 0.01), being higher in the PL group. From the fourth week on, both groups achieved low 'infantile' concentrations to the end of the followup period in week 10 (P > 0.05). The T values of the acyline group did not differ between before and after the third week (P > 0.05; Fig. 1).

Microscopic evaluation revealed that all the males presented epididymal spermatozoa with >90% of normal motility and morphology. Histological assessment showed that the ACY group presented a reduced height of the epithelium (P < 0.01) due to the diminished number of some of the germinal cells such as spermatogonia (P < 0.01),

Table 1. Morphometric data (mean \pm SEM) of male cats which hadbeen postnatally administered acyline (n = 6) or a placebo (n = 6).No significant differences were found

	Acyline	Placebo	Р
Testis weight (g)	1.70 ± 0.11	1.65 ± 0.01	0.331
Testicular volume (cm ³)	1.92 ± 0.09	1.33 ± 0.65	0.378
Gonadosomatic index (%)	0.08 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.461





Fig. 1. Faecal testosterone (mean \pm SEM) of the male kittens of Table 1: Acyline-treated (solid circles) and placebo-treated (empty circles) cats. Different letters above time points represent differences at P < 0.01

round and elongated spermatids (P < 0.05), and spermatozoa (P = 0.025) accompanied with an enlarged luminal area (P < 0.01) with more detritus (P < 0.01) inside when compared to PL testes which appeared completely normal (Table 2; Fig. 2A,B; França and Godinho, 2003). The spermatids/Sertoli cells ratio was also reduced in ACY cats (P < 0.05). Immunohistochemistry against P450SCC and P450c17 revealed a specific staining in the Leydig cells of both groups (Fig. 3). Although no differences in PIA were found for either P450scc (P > 0.05) or P450c17 (P > 0.05) between the groups, the MGS was lower for P450c17 (P < 0.01) and had a tendency to be decreased for P450scc (P < 0.1) in ACY cats (Fig. 4).

DISCUSSION

In spite of the high antagonist doses used in the present study, neither the age nor the body weight at puberty of the



Fig. 2. Testicular tissue of the cats of Table 1. Haematoxylin and eosin (HE), \times 25. A) Placebo: Normal germinal epithelium. B) Acyline: Thin seminiferous epithelium containing only spermatogonia, primary spermatocytes and Sertoli cells. A cumulus of cellular detritus in the tubular lumen

acyline-treated cats were different from those of the placebo animals. Furthermore, both parameters were within the normal range for the species (Feldman and Nelson, 1996). As expected for GnRH analogues (Gobello, 2012), no clinical side effects, except a case of unilateral inguinal cryptorchidism, appeared. Similarly, two dogs which were treated postnatally with a GnRH agonist presented bilateral

Table 2. Testicular histological components (mean \pm SEM) of the male cats of Table 1. Different superscript letters in each line represent: a vs. b (P < 0.01) and c vs. b (P < 0.05)

	Acyline	Placebo	Р
Tubular diameter (µm)	205.54 ± 2.38^{a}	$194.54 \pm 2.97^{\rm b}$	0.0010
Germinal epithelium height (µm)	19.42 ± 0.5^{a}	38.35 ± 1.28^{b}	< 0.0001
Luminal area (μm^2)	6689.55 ± 319.12^{a}	4564.56 ± 252.33^{b}	< 0.0001
Detritus (µm ²)	1737.68 ± 225.05^{a}	$111.98 \pm 18.55^{\rm b}$	< 0.0001
Spermatogonia/tubule	2.93 ± 0.15^{a}	5.14 ± 0.21^{b}	< 0.0001
Primary spermatocytes/tubule	61.36 ± 1.78^{a}	67.68 ± 2.70^{a}	0.3113
Secondary spermatocytes/tubule	0.00^{a}	0.01 ± 0.01^{a}	0.3173
Round spermatids/tubule	$35.29 \pm 3.21^{\circ}$	$49.27 \pm 4.17^{\rm d}$	0.0395
Elongated spermatids/tubule	$8.98 \pm 1.85^{\circ}$	$11.94 \pm 2.34^{\rm d}$	0.0496
Spermatozoa/tubule	$16.97 \pm 2.92^{\circ}$	28.56 ± 2.92^{d}	0.0252
Sertoli cells/tubule	24.44 ± 0.63^{a}	23.91 ± 0.58^{a}	0.6765
Spermatids/Sertoli ratio	$2.43 \pm 0.34^{\circ}$	$3.19 \pm 0.37^{\rm d}$	0.0263
Leydig cells/intertubular space	5.08 ± 0.56^{a}	5.14 ± 0.25^{a}	0.4461
Leydig cell nuclear area (µm²)	32.38 ± 0.37^{a}	$30.15 + 0.42^{a}$	0.3351





Fig. 3. Immunostaining against P450SCC (A–C) and P450c17 (D–F). Testicular tissue of a placebo-treated animal (PL) given in A and D, testicular tissue of an acyline-treated animal (ACY) given in B and E. Images C and F represent isotype controls. Leydig cells stained immunopositive against P450SCC (A, B) and P450c17 (D, E), whereas no staining was visible in isotype controls. Examples of Leydig cells indicated by arrows. Magnification: \times 400 (A–E), \times 200 (F)



Fig. 4. Percentage of immunopositive area (PIA) and mean grayscale (MGS) for P450SCC and P450c17 in acyline-treated animals (ACY, n = 6) and controls (PL, n = 4). Results are given as mean \pm SD

cryptorchidism at puberty (Faya et al., 2013). The insufficient perinatal androgen concentrations might prevent or delay testicular descent in these animals.

The acyline doses used in this study suppressed the initial faecal T concentrations that appeared in the control cats. Furthermore, in males treated with this antagonist, faecal T values did not vary and remained low throughout the whole study period. Thus, the acyline suppression of faecal T obtained in this trial was deeper than that obtained previously using 33 mg/100 g where no low concentrations could be caused (Carranza et al., 2014). This finding further corroborates the expected dose effect of the antagonist (Gobello, 2012). Gross testicular parameters as well as their relationship with body weight also were not altered by the

antagonist treatment. Conversely, the postnatal GnRH antagonist Ac-D2Nal1, D4-Cl-Phe2, D-Trp3, D-Arg6, D-Ala10]-GnRH*HOAc (1 mg kg⁻¹) reduced testicular weight in male piglets (Ziecik et al., 1989). These differences could be attributed to species, drug and methodological differences among reports. In our previous study with low postnatal doses of acyline in cats, a diminution of scrotal volume could be detected at puberty (Carranza et al., 2014). This disparity could have been caused by the fact that those males achieved puberty earlier and, therefore, the effect of the antagonist was closer.

In coincidence with the present histological testicular findings a severe impairment of spermatogenesis was found in rats treated postnatally with a GnRH antagonist



(Huhtaniemi et al., 1986). Neonatal felids treated with a GnRH agonist also evidenced diminished germinal epithelial height at puberty (Carranza et al., 2015). Furthermore, in this study, the spermatids/Sertoli cells ratio, which is considered an expression of spermatogenic efficiency (Russell and Peterson, 1984), was reduced in the acyline-treated animals.

In another study in neonatal rats using a GnRH antagonist, at reproductive maturation, final Leydig cell number and nuclear volume were comparable with the control volume (Sharpe et al., 2003), suggesting that adult steroid production is not affected by early androgen deprivation. Similarly, Leydig cell number and nuclear area were not affected in these cats. Furthermore, immunohistochemical findings demonstrated that only the mean staining intensity of P450c17 expression was reduced in these neonatal treated cats, whereas the percentage immunopositive area did not differ for P450SCC and P450c17 in acyline- and placebotreated animals. The previously mentioned results suggest that, in cats, early-in-life T concentrations may not have a significant role in adult androgen production. To the best of the authors' knowledge, the steroidogenic evaluation of postnatally endocrine disrupted cats had not been performed before.

Although in this study the fertility of the treated cats was not tested, rats (Huhtaniemi et al., 1986; Kolho et al., 1988; Simon et al., 2012) treated in a similar way proved to be infertile. Further work is still necessary to determine if this outcome is also valid for felids. It was concluded that two high postnatal doses of the GnRH antagonist acyline suppressed faecal T concentrations for three weeks and caused a severe impairment of the germinal epithelium accompanied by a low presentation of unilateral cryptorchidism at puberty. These findings support further investigations on the use of postnatal GnRH antagonists for feline contraception/ sterilisation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by the Teaching Incentive Program of UNLP (V269) and the Minister of Science & Technology Cordoba (45/16), Argentina. The authors thank the Contraception & Reproductive Health Branch Center for Population Research, National Institute of Child Health & Human Development, National Institutes of Health, USA, for providing acyline. MG and CM are Research Fellows and MF and CG are Career Scientists of CONICET, Argentina.

REFERENCES

- Bancroft, D., Stevens, A. and Turner, D. R. (1990): Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone Inc., Edinburgh–London–Melbourne–New York. 725 pp.
- Boothe, H. W. (1993): Testes and Epididymides. Textbook of Small Animal Surgery. pp. 1325–1336.

- Brown, J., Wakter, S. and Steinman, K. (2008): Endocrine Manual for Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species. Conservation and Research Center. USA. Smithsonian's National Zoological Park, Virginia. p. 62.
- Carranza, A., Faya, M., Fernandez, P., Barbeito, C. and Gobello, C. (2015): Histologic effect of a postnatal slow-release GnRH agonist on feline gonads. Theriogenology 83, 1368–1372.
- Carranza, A., Faya, M., Merlo, M. L., Batista, P. and Gobello, C. (2014): Effect of GnRH analogs in postnatal domestic cats. Theriogenology 82, 138-143.
- Faya, M., Carranza, A., Miotti, R., Ponchón, T., Furlan, P. and Gobello, C. (2013): Fecal estradiol- 17β and testosterone in prepubertal domestic cats. Theriogenology **80**, 584–586.
- Feldman, E. C. and Nelson, R. W. (1996): Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In: Feldman, E. C. and Nelson, R. W. (eds) Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. W. B. Saunders Co., Philadelphia. 785 pp.
- França, L. R. and Godinho, C. L. (2003): Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). Biol. Reprod. 68, 1554– 1561.
- Gentil, M., Hoffmann, B., Spang, A., Failing, K. and Goericke-Pesch, S. (2012): Restart of steroidogenesis in dogs during recrudescence of testicular function following downregulation with a GnRH-agonist implant. Cell Tissue Res. 350, 513–523.
- Gobello, C. (2012): Effects of GnRH antagonists vs. agonists in domestic carnivores: a review. Reprod. Domest. Anim. 47, 373–376.
- Heinrich, A. and De Falco, T. (2020): Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. Andrology **8**, 903–914.
- Huhtaniemi, I. T., Nevo, N., Amsterdam, A. and Naor, Z. (1986): Effect of postnatal treatment with a gonadotropin-releasing hormone antagonist on sexual maturation of male rats. Biol. Reprod. 35, 501–507.
- Kolho, K. L. and Huhtaniemi, I. (1989): Neonatal treatment of male rats with a gonadotropin-releasing hormone antagonist results in altered function of the pituitary-testicular axis in adult age. Biol. Reprod. **41**, 1084–1090.
- Kolho, K. L., Nikula, H. and Huhtaniemi, I. (1988): Sexual maturation of male rats treated postnatally with a gonadotrophinreleasing hormone antagonist. J. Endocrinol. **116**, 241–246.
- Körber, H. and Goericke-Pesch, S. (2019a): Expression of PTGS2, PGFS and PTGFR during downregulation and restart of spermatogenesis following GnRH agonist treatment in the dog. Cell Tissue Res. 375, 531–541.
- Körber, H. and Goericke-Pesch, S. (2019b): Expression of prostaglandin (PG) D synthase lipocalin and hematopoietic type and PG D receptor during restart of spermatogenesis following downregulation using a slow release GnRH agonist implant in the dog. Cell Tissue Res. **378**, 359–370.
- Lin, C. C., Huang, W. J. and Chen, K. K. (2009): Measurement of testicular volume in smaller testes: how accurate is the conventional orchidometer? J. Androl. 30, 685–689.
- Mann, D. R. and Fraser, H. M. (1996): The neonatal period: a critical interval in male primate development. J. Endocrinol. 149, 191–197.
- Mehl, N. S., Srisuwatanasagul, S., Swangchan-Uthai, T., Sirivaidyapong, S. and Khalid, M. (2017): GnRH-agonist implants

suppress reproductive function and affects ovarian LHR and FSHR expression in prepubertal female cats. Theriogenology **87**, 250–258.

- Peterson, J. K., Moran, F., Conley, A. J. and Bird, I. M. (2001): Zonal expression of endothelial nitric oxide synthase in sheep and rhesus adrenal cortex. Endocrinology 142, 5351–5363.
- Pryor, J. L., Hughes, C., Foster, W., Hales, B. F. and Robaire, B. (2000): Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. Environ. Health Perspect. **108**, 491–503.
- Roby, K. F., Larsen, D., Deb, S. and Soares, M. J. (1991): Generation and characterization of antipeptide antibodies to rat cytochrome P-450 side-chain cleavage enzyme. Mol. Cell. Endocrinol. 79, 13–20.
- Russell, L. D. and Peterson, R. N. (1984): Determination of the elongate spermatid–Sertoli cell ratio in various mammals. Reproduction **70**, 635–641.

- Sharpe, R. M., Rivas, A., Walker, M., McKinnell, C. and Fisher, J. S. (2003): Effect of neonatal treatment of rats with potent or weak (environmental) oestrogens, or with a GnRH antagonist, on Leydig cell development and function through puberty into adulthood. Int. J. Androl. 26, 26–36.
- Simon, L., Avery, L., Braden, T. D., Williams, C. S., Okumu, L. A., Williams, J. W. and Goyal, H. O. (2012): Exposure of neonatal rats to anti-androgens induces penile mal-developments and infertility comparable to those induced by oestrogens. Int. J. Androl. 35, 364–376.
- Valiente, C., de la Sota, P. E., Arauz, S. and Gobello, C. (2014): Ejaculation training, seminal alkaline phosphatase and semen preservation through cooling in a milk-based extender in domestic cats. J. Feline Med. Surg. 16, 312–316.
- Ziecik, A. J., Esbenshade, K. L. and Britt, J. H. (1989): Effects of a gonadotrophin-releasing hormone antagonist on gonadotrophin secretion and gonadal development in neonatal pigs. Reproduction 87, 281–289.

Theriogenology 138 (2019) 47e51

Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com

Physical, histological, endocrinological and steroidogenical evaluation of male cats postnatally exposed to sexual steroids



THERIOGENOLOGY

M. Grisolia ^c, M. Faya ^{b, c}, C. Marchetti ^c, M.Lopez Merlo ^{a, c}, F. DFrancisco ^c, M.J. Bellini ^c, C. Gobello ^{a, c, *}

^a Faculty of Veterinary Sciences, National University of La Plata, Argentina

^b Catholic University of Cordoba, Argentina

^c National Research Council, Argentina

ARTICLEINFO

Article history: Received 31 March 2019 Received in revised form 24 June 2019 Accepted 24 June 2019 Available online 2 July 2019

Keywords: Felid Testis Contraception Neonate Endocrine disruption

ABSTRACT

To test the hypothesis that postnatal sexual steroids induce an impairment of domestic male cat reproductive function, this study describes the physical, endocrine, steroidogenical and histological effects of a single, high dose of a postnatal sexual steroid in this species. Twenty male kittens were randomly assigned within the first 24 h of birth to: Testosterone enanthate 12.5 mg sc (TE; n 1/4 8), medroxyprogesterone acetate 10 mg sc (MA; n ¼ 6), or Placebo sc (PL; n ¼ 6). The cats were followed until puberty when they were castrated. Kittens achieved puberty without age differences among groups (P > 0.05). Two MA cats presented abnormal testicular descent. Histological evaluation of the MA (P < 0.01), but not of TE testes revealed decreased diameter (P < 0.01) and epithelial height (P < 0.01) of the seminiferous tubules. Leydig cell nuclear area was also reduced in this group. Conversely, tubular/ intertubular ratio was increased in TE animals (P < 0.01). Quantitative real-time PCR analysis of mRNA expression of testicular tissue revealed no significant differences among groups for StAR, CYP17A1 and androgen receptors. TE animals showed decreased CYP19A1 mRNA expression (P < 0.05). In the first 4 postnatal weeks, fecal testosterone (T) values were high, basal and intermediate in TE, MA and PL (P < 0.05), respectively. These differences progressively diminished and the three groups presented basal T concentrations from the 7th week on (P > 0.05). It was concluded that the postnatal progestagen initially suppressed the gonadal axis and caused an impairment of spermatogenesis and testicular descent at puberty. Androgen treatment caused downregulation of the final steroidogenic cascade.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The effect of perinatal sexual steroids on adult reproduction has been mainly described in female mammals [1e9]. Importantly, males require a "priming" exposure to testosterone (T) before and immediately after birth if they are to show normal reproductive development and behavior as adults [10]. Conversely, exogenous massive doses of androgens during these critical developmental periods produced both central and peripheral permanent disturbances in male laboratory rodents [11]. Specifically, neonatal adrogenization of rats decreased testicular [12], prostate and seminal vesicles weights [11] when the animals reached maturity. Alterations in testicular enzymes involved in androgen synthesis and metabolism have been demonstrated *in vitro* [13] as well as in rats androgen-treated as neonates [14.15].

In pigs early postnatal androgen administration not only reduced serum T but also the size of the seminiferous tubules and testicular weight [16]. In this same species, postnatal depot progestins have been tested as an alternative for castration [17]. Similarly, in mice the neonatal administration of the progestagen, cyproterone acetate, induced hypoplasia and hypotrophy of the epididymis and seminal vesicles, respectively [18] and a high percentage of infertility when injected until day 10 after birth [19]. Additionally, neonatal exposure to either T [20] or progesterone [21], reduced the sexual behavior of male rats.

Domestic cats are extremely prolific breeders and their overpopulation is a severe worldwide problem. The pursuit for



^{*} Corresponding author. Laboratory of Reproductive Physiology Faculty of Veterinary Sciences, National University of La Plata, 60 y 118. La Plata CC 296 (B 1900 AVW), Argentina.

E-mail addresses: cgobello@fcv.unlp.edu.ar, cristinagobello@gmail.com (C. Gobello).

practical, inexpensive, effective and safe alternatives for surgical castration is now a priority for cat breeders, pet owners, and for those involved in the management of feral felids. Furthermore, if tom cats were rendered permanently or transiently sterile, female reproductive health could also be preserved as no hormonal contraceptive treatments would be necessary in this gender.

Although postnatal administration of sexual steroids could represent a contraceptive or a sterilizing option for males, to our knowledge, there are no studies in cats evaluating these protocols for these purposes. To test the hypothesis that the administration of sexual steroids during the critical postnatal time window induces an impairment of domestic male cat reproductive function, this study describes the physical, endocrine, steroidogenical and histological effect of a single, high dose, time-released androgen or progestin on domestic male cat reproduction. Secondarily, the clinical safety of these pharmaceutical protocols was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Animals and pharmacological protocols

Twenty (11 litters) newborn littermate male kittens from the National University of La Plata institutional cat colony were included in this study. The animals were sexed according to anogenital distance and identified at birth, reared under 14 h of light per day, weaned at the age of 40 days and fed premium commercial kitten food and water *ad libitum*. This study was reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee of the Veterinary School of the National University of La Plata and all experiments were conducted under the guidelines established in The Guide for The Care and Use of Laboratory Animals, USA.

The kittens of the same litters were randomly assigned to one of the following treatment groups within the first 24 h of birth: Testosterone enanthate (Testoviron Depot 250, Bayer, Argentina) 12.5 mg total dose subcutaneously (TE; n_4 8), medroxyprogesterone acetate 10 mg (Singestar MP, Konig, Argentina) total dose subcutaneously (MA; n 1⁄6), or Placebo: 0.05 ml corn oil subcutaneously injection (PL; n_4 6). The doses were selected according to previous pilot studies in cats [7,8] based on Barraclough and Gorski (1961; [22]) and Romagnoli & Concannon (2003; [23]).

2.2. Follow up

All the animals were subsequently assessed until the first indications that puberty occurred. The felids were observed more than 1.5 h twice a day looking for their behavior. The cats were also physically examined including body weight (kg), balano-preputial separation, and penile spines once a week. Puberty was defined as complete balano-preputial separation and the appearance of penile spines [24].

2.3. Fecal collection, extraction and hormone determinations

Fecal samples were collected and frozen weekly during the first month and then on weeks 7 and 10 for T measurement (ng/ml). For this purpose, each cat was confined in an individual cage with clean sanitary litter during one night. During the first 4 weeks of age, the neonates had to be rectally stimulated by a thin plastic suppository attached to a string to obtain the sample. Testosterone was extracted using the methods described by Brown et al. (2008; [25]) and, then, determined using electrochemiluminescence immunoassays (Elecsys Testo II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Inter- and intra-assay coefficients of variation of the assays was <10% and sensitivity were 0.025 ng/mL. All fecal data were expressed on a wet-weight basis [26].

2.4. Orchidectomy

The cats were castrated immediately after puberty was diagnosed [27]. For the surgery, the animals were pre-medicated with atropine sulfate, (Atropine Sulfate, John Martin; 0.04 mg/kg, subcutaneously), acepromazine maleate (Acedan, Holiday; 0.03 mg/kg subcutaneously), and butorphanol (Torbutol Plus, Fort Dodge; 0.2 mg/kg, intramuscularly). Anesthesia was induced with sodium thiopental (Pentovet TM, Richmond; 8 mg/kg, intravenous). After the males were endotracheally intubated, anesthesia was maintained with isoflurane and oxygen in a closed system. After surgery ketoprofen (Ketofen[®], Fort Dodge; 1 mg/kg) was injected subcutaneously (once) and then orally every 24 h for 4 additional days. After orchidectomy all the cats were placed for adoption.

2.5. Gross, seminal and histological examination

Immediately after surgical removal, the testes were measured (length, width and depth; cm) using a Vernier caliper and weighed (g). Gonadal volume (cm³ [28]) and gonadosomatic index (%; [29]) were also calculated.

Spermatozoa were obtained by flotation method with manual slicing of the cauda epididymis of each testis. Incisions were made every 2 mm and then the cauda epididymes of each cat were allowed to float into a laboratory dish with 2.5 ml of a commercial semen extender at 37 °C for 10 min. The presence of sperm forward progressive motility was assessed at 400X magnification. Then, the samples were centrifuged at 4 °C for 1400 g/min for 8 min to facilitate the removal of most part of the supernatant and spermatozoa morphology was evaluated by Giemsa stain, under 1000X magnification using bright field microscopy [30].

One testis was sectioned longitudinally, placed in Bouin's fixative for 24 h and then changed to alcohol 70 and processed routinely with paraffin embedding. After processing, 5 mm serial sections were cut, mounted on slides, dried, deparaffinized in xylene, rehydrated in graded ethanol solutions and stained with hematoxylin and eosin [31].

Histological images were obtained from a microscope (Olympus BX50, Tokyo, Japan; 10X or 40X through an attached digital RGB video camera (Evolution VF Color, Q Imaging, USA) and digitalized in a 24 bit true color TIFF format. Thirty round tubular profiles per testis were evaluated for mean tubular diameter (Mm), mean germinal epithelium height (Mm) as well as the mean number of each cellular components i.e. spermatogonia, primary and secondary spermatocytes, round spermatids, elongated spermatids, spermatozoa and Sertoli cells. The number of Leydig cells in 20 complete intertubular spaces was also recorded and their nucleus areas (Mm²) measured. The proportion of the tubular/intertubular compartment areas and the number of spermatids supported by a single Sertoli cell were also calculated. Images were analyzed by planimetry (Image Pro Plus v6.0-Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).

2.6. Tissue collection and quantitative PCR-Western blot

The remaining testis of each cat was stored at-80 °C after snapfreezing till RNA extraction. The expression of the mRNAs of steroidogenic enzymes (StAR)), cytochrome P450 17**a**-hydroxylase-17, 20-lyase (P450c17/CYP17A) and cytochrome P450 aromatase (CYP19), as well as androgen steroid receptor (AR), were quantified by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). For the design of the corresponding primers, a cloning software (Clone Manager 9, Sci-Ed Software) was used, applying the design quality

Table 1	
Primer sequences	for mRNA of target genes.

Enzime/receptor	Genbank	Primer Fw	Primer Rv
STAR	NM_001246196	CGGAGTTCTCTGCTTGGTTC	GTACTGTGTCCCCATTTGCC
CYP17a1	NM_001009371	CCAAGGAGGTGCTTGTCAAG	CTTGAACAGGGCAAAGGTGG
CYP19a1- aromatasa (pred)	GU306147.1	ACACAGTCACTACAGCTCCC	GTCGAACAGCTTTCCAGAGG
AR (pred)	XM_004000575.2	GTCAGGCAAGCTCAAGGATG	GATAGGTTTTGGACGGTGGC
GAPDH	XM_006933438	TCATCCCTGCTTCTACTGGC	CCTGCTTCACCACCTTCTTG

criteria by default of the program and using the mRNA molecules of the corresponding genes as obtained from the base of Genbank data (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) as template (Table 1). RNA extractions were carried out through the thiocyanate-phenolchloroform [32] protocol using TRIzol® (Life technologies®). RNA extractions were quantified using a Nanodrop spectrophotometer. Then, the total cDNA was synthesized from these samples using Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) with random hexanucleotides. As controls for the absence of genomic DNA in the RNA samples, a reaction was carried out with all the components but the RT enzyme (RT-controls). To verify the validity of the obtained cDNA samples, end-point PCR was performed by amplifying the actin gene in the RNA samples transcribed with RT and in the controls (RT-). The q-PCR reactions were carried out in triplicate. The relative levels of mRNA expression was calculated using the DDCt method, taking as endogenous control beta-actin or glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH). In parallel, total proteins were recovered from the supernatant phase (phenol-ethanol) of the thiocyanate-phenol-chloroform extraction [32]. The total protein content for the Western blot technique was determined by Lowry's method [33]. The proteins were separated by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels with percentages between 8 and 15%, depending on the size of the protein under study, transferred to membranes of polyvinyl bifluoride (Immun-Blot PVDF membrane, BioRad) using the wet system Mini Trans-Blot Cell from BioRad and incubated with the appropriate primary antibodies and with the corresponding secondary antibody bound to peroxidase (Pierce® Peroxidase Detection Kit, Thermo ScientificTM). The revealment was done by chemiluminescence with luminol and coumaric reagents (enhanced chemiluminiscence, ECL detection). The intensity of the bands was quantified using Image Pro Plus v6.0 image analysis software (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).

2.7. Statistical analysis

Normality of distribution of results was tested using a Shapiro e Wilk normality test. Fecal T concentrations in the different treatments (TE vs. MA vs. PL) were compared throughout the weeks by repeated measures ANOVA followed by Tukey comparison post hoc test. Physical, histological and real time PCR treatment group differences were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test. Results were expressed as mean \pm SEM. A P < 0.05 was considered to be significant.

3. Results

Fecal T concentration differed among treatments throughout the first 4 postnatal weeks (P < 0.05) but not later. Although in the first week, T values were dissimilar among the 3 treatments (P < 0.01), these differences progressively diminished up to week 4 when only T values remained higher than MA and PL which did not differ between themselves (P < 0.01). Then, in TE fecal T concentrations rapidly decreased up to postnatal week 7. Basal concentrations were found in the three treatment groups from the 7th to the 10th week (P > 0.05; Fig. 1).



Fig. 1. Fecal testosterone (mean \pm SEM) of 20 male kittens treated postnatally with testosterone (solid circles), medroxyprogesterone acetate (solid triangles), or a placebo (empty circles). Different letters above each time points represent differences at P < 0.05.

Kittens achieved puberty without differences among groups (190.4b 24.2 vs. 162.4 b 6.3 vs. 221.7b 23.7 days for TE, MA and PL, respectively; P > 0.05). Body weight (2.48 \pm 0.25 vs. 2.71 \pm 1.81 vs. 2.78 b 2.8 kg, P > 0.1) were normal and did not also differ among the treatments. One MA cat presented unilateral abdominal cryptochidism and another animal of the same group had a unilateral delayed descended testis which descended into the scrotum at the age of 117 days. None of the cats presented other clinical side effects (P > 0.1) nor behavioral alterations throughout the study period.

Gross testicular parameters including weight, volume as well as the gonadosomatic index did not varied among groups (P > 0.1, Table 2). Microscopic evaluation revealed that all the males presented few epididymal spermatozoa with normal motility and morphology. Histological evaluation (Table 3; Fig. 2) of the MA testes, showed significantly decreased diameter and epithelial height of the seminiferous tubules when compared with the other treatments. This tubular narrowing was due to the diminished tubular number of spermatogonias, primary spermatocytes and spermatides in this group. Conversely, tubular/intertubular relationship was significantly increased in TE animals. Although vacuolization could be appreciated within both TE and MA seminiferous epitheliums, this finding was more prevalent in MA testes (Fig. 2B). Finally, spermatids/Sertoli ratio and the Leydig cell nuclear area were also reduced in MA but not in TE group when compared with PL.

Quantitative real-time PCR analysis of mRNA expression

Table 2

Morphometric data (mean \pm SEM) of the 20 male cats which had been postnatally administered testosterone (TE), medroxyprogesterone acetate (MA) or a placebo (PL).

	Testosterone	MA	Placebo
Body weight (kg)	2.65 ± 0.10	2.71 ± 0.18	2.85 ± 0.16
Testicular volume (cm ³)	1.75 ± 0.56	1.41 ± 0.22	1.33 ± 0.65
Gonado-somatic index (%)	0.11 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.11 ± 0.00

Table 3

Testicular histological components (mean ± SEM) of the male cats of Table 2. Different subscript letters in each line represent P < 0.05 values.

	Testosterone	MPA	Placebo
Tubular diameter (m m)	196.93 ± 1.76^{a}	174.46 ± 2.54 ^b	194.54 ± 2.97^{a}
Germinal epithelium height (m m)	40.74 ± 0.91^{a}	33.61 ± 0.98 ^b	38.35 ± 1.28^{a}
Spermatogonia/tubule	2.43 ± 0.16^{a}	0.6 ± 0.08^{b}	2.18 ± 0.19^{a}
Primary spermatocytes/tubule	78.65 ± 1.88^{a}	57.77 ± 1.86 ^b	67.68 ± 2.70^{a}
Secondary spermatocytes/tubule	0.00 ^a	0.01 ± 0.01^{a}	0.01 ± 0.01^{a}
Round spermatids/tubule	17.57 ± 2.22^{a}	36.93 ± 3.35 ^b	49.27 ± 4.17^{a}
Elongated spermatids/tubule	50.28 ± 3.26^{a}	9.71 ± 2.04^{b}	11.94 ± 2.34^{a}
Spermatozoa/tubule	33.79 ± 2.46^{a}	26.35 ± 2.64^{a}	28.56 ± 2.92^{a}
Sertoli cells/tubule	23.74 ± 0.46^{a}	24.06 ± 0.61^{a}	23.91 ± 0.58^{a}
Sertoli/spermatids ratio	3.33 ± 0.28^{a}	2.15 ± 0.32^{b}	2.89 ± 0.32^{a}
Meiosis/tubule	0.26 ± 0.04^{a}	0.18 ± 0.04^{a}	0.14 ± 0.04^{a}
Leydig cells/intertubular space	5.63 ± 0.27^{a}	7.49 ± 0.34^{a}	5.14 ± 0.25^{a}
Tubular/intertubular ratio	$0.103 \pm 0.00^{\rm b}$	0.077 ± 0.00^{a}	0.080 ± 0.00^{a}
Leydig cell nuclear area (m m ²)	4.07 ± 0.09^{a}	$3.36 \pm 0.10^{\rm b}$	3.84 ± 0.13^{a}



Fig. 2. Testicular tissue of the cats of Fig. 1 (H&E; 25X). (A) Testosterone: quite complete seminiferous epithelium having a few small vacuoles and cellular detritus in the lumen. (B) Medroxyprogesterone acetate: thin seminiferous epithelium containing some vacuoles. (C) Placebo: Normal germinal epithelium.

(Table 4) revealed no differences among TE vs. MA vs. PL groups for StAR (P > 0.1) and CYP17A1 (P > 0.05). Conversely, TE treatment caused a decrease in CYP19A1 mRNA expression when compared to PL (<P 0.05) but without differences with MA. Neither TE nor MA affected mRNA level, expression of AR (P > 0.1).

4. Discussion

In female cats postnatal supraphysiological administration of androgens and progestagens caused anovulation [7] but did not

prevent uterine gland adenogenesis [8], respectively. Up to the authors' knowledge this is the first report of postnatal administration of sexual steroids in male cats with contraceptive purposes. As expected, in TE group, the hormone assay mainly evidenced

the postnatal exogenous depot T administration which caused high T concentration during the first 4 postnatal weeks. Endogenous T secretion was probably suppressed. Conversely, the postnatal basal T concentrations found in the MA group clearly showed that the exogenous progestins caused a negative effect on gonadotrophin secretion and, therefore, in T production. The comparatively high T values in PL animals during the first 4 weeks of life were previously described in this species as a physiological postnatal surge [26].

In this study both puberty age and body weight at puberty were

Table 4 Quantitative real-time PCR analysis of mRNA expression of steroidogenic enzymes: steroidogenic acute regulatory protein (StAR), cytochrome P-450 steroid 17**a**-monooxygenase (CYP17A1, aromatase (CYP19A1) and androgen receptor (AR) of the male cats of Table 2. Different subscript letters in each column represent P < 0.05 values.

	Star	Cyp17	Cyp19	AR
Testosterone	67.8 ± 21.0	197.0 ± 10.5	46.1 ± 0.5^{a}	22.2 ± 6.3
Progesterone	377.2 ± 160.9	$948.5 \pm 198.3^{*}$	$53.9 \pm 11.6^{a,b}$	40.3 ± 17.3
Placebo	164.1 ± 47.7	275.7 ± 86.3	113.6 ± 27.1^{b}	23.1 ± 5.6

normal and not affected by the treatments. These findings were in line to what has been previously described in carnivore' females postnatally treated with sexual steroids [7e9] and also in male pigs treated postnatally with medroxyprogesterone acetate [17].

It could also be speculated that the abnormalities in testicular descent of the 33% of the animals of MA group were probably due to the insufficient endocrine background at the postnatal time window of final physiological testicular descent. Similar deficiencies in testicular decent have been observed in dogs postnatally treated with GnRH analogs [34]. Although, the absence of other clinical side effects were in line with previous reports using the same protocols [7e9], the safety of these treatments should also be tested in the long term.

In spite that gross testicular characteristics differences could not be evidenced in any treatment group, histological evaluation of the seminiferous tubules revealed diminished spermatogenesis and vacuolization in the MA group. The progestin treated cats had reduced cellular components of their germinal epithelium. Similar histological findings have been previously described in testes of pigs which had been administered medroxyprogesterone acetate postnatally [17]. The tubular vacuoles usually represent a testicular parenchyma end-stage process [35]. Even the spermatogenic efficiency, expressed as spermatids/Sertoli ratio [36], was also diminished in this group. It can be postulated that in feline neonates, the same than in other mammalian males, physiological androgen concentrations are required for normal testicular development, and early insufficient concentrations of T produce long term or irreversible alterations in spermatogenesis. Conversely, the area occupied by seminiferous tubules was significantly increased in TE animals and even some cellular components of the germinal epithelium were slightly increased in these animals. It is difficult to explain why a supraphysiological exogenous dose of T did not alter

any histological parameters in this group. It could be speculated that larger doses were necessary to cause the adverse peripheral effects that have been described for neonatal androgenization in other male mammals [11,12].

Based on mRNA expression studies it could be said that postnatal TE treatment produced a decrease in the activity of Cyp19 disrupting the final step of the steroidogenic cascade i.e. estrogen production [37]. Similarly, **5a** reductase activity decreased after neonatal T treatment in rats [38]. Although estrogens were shown to be essential for spermatogenesis [39], its exact role in male fertility is not clear [40].

It was concluded that a high dose of progestagen during the critical feline postnatal time window initially suppressed the gonadal axis and caused an impairment of spermatogenesis and 33% of abnormal testicular descent at puberty. Conversely, a similar androgen protocol caused downregulation of the final steroidogenic cascade without provoking testicular alterations. In vivo fertility tests are still necessary to define the actual effect of these postnatal endocrine disruptive protocols on male cat fertility. Not only long term reproductive follow up but also the eventual appearance of side effects of theses high doses of sexual steroids should be further studied before their widespread use could be widely recoTable 4: Quantitative real-time PCR analysis of mRNA expression of steroidogenic enzymes: steroidogenic acute regulatory protein (StAR), cytochrome P-450 steroid 17a-monooxygenase (CYP17A1, aromatase (CYP19A1) and androgen receptor (AR) of the male cats of Table 2. Different subscript letters in each column represent P < 0.05 values.

Conflicts of interest

The authors do not have any financial nor personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence the study.

Acknowledgments

This research was partially supported by CONICET (PIP 001-2010) and FONCYT (PICT 426-2014 to CG). MG, CM, FD'F and MLM are a Research Fellows, and MF, MJB and CG are Career Scientists of CONICET, Argentina.

References

- Barraclough CA, Gorski RA. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. Endocrinology 1961;68:68e79.
- [2] Beach FA, Buehler MG, Dunbar IF. Sexual cycles in female dogs treated with androgen during development. Behav Neural Biol 1983;38:1e31.
- [3] Pinilla L, Trimiño E, Garnelo P, Bellido C, Aguilar R, Gaytán F, Aguilar E. Changes in pituitary secretion during the early postnatal period and anovulatory syndrome induced by neonatal oestrogen or androgen in rats. J Reprod Fertil 1993;97:13e20.
- [4] Mena MA, Arriaza CA, Tchernitchin AN. Early postnatal androgenization imprints selective changes in the action of estrogens in the rat uterus. Biol Reprod 1992;46:1080e5.
- [5] Cooke PS, Ekman GC, Kaur J, Davila J, Bagchi IC, Clark SG, Dziuk PJ, Hayashi K, Bartol FF. Brief exposure to progesterone during a critical neonatal window prevents uterine gland formation in mice. Biol Reprod 2012:8. 86:63.
- [6] Spencer TE, Gray CA. Sheep uterine gland knockout (UGKO) model. Methods Mol Med 2006;121:85e94.
- [7] Demaldé L, López Merlo M, Vercellini R, Barbeito CG, Fernández P, Gobello C. Disrupting effect of androgens in postnatal female domestic cats. Anim Reprod Sci 2016;171:65e71.
- [8] López Merlo M, Faya M, Blanco P, Carranza A, Barbeito C, Gobello C. Failure of a single dose of medroxyprogesterone acetate to induce uterine infertility in postnatally treated domestic cats. Theriogenology 2016;85:718e23.
- [9] Ponchon T, López Merlo M, Faya M, Priotto M, Barbeito C, Gobello C. Postnatal exposure to a progestin does not prevent adenogenesis in domestic dogs. J Vet Sci 2016;17(1):111e3.

Schulz KM, Richardson HN, Zehr JL, Osetek AJ, Menard TA, Sisk CL. Gonadal hormones masculinize and defeminize reproductive behaviors during puberty in the male Syrian hamster. Horm Behav 2004;45:242e9.

- [11] Piacsek BE, Hostetter MW. Neonatal androgenization in the male rat: evidence for central and peripheral defects. Biol Reprod 1984;30:344e51.
- [12] Moguilevsky JA, Scacchi P, Szwarcfarb B. Effect of estrogens on LH- and FSHlevels in prepuberal male and female androgenized rats. Experientia 1977;33: 1533e4.
- [13] Vanderstichele H, Eechaute W, Lacroix E, Leusen I. Influence of neonatal androgenization on the testicular steroidogenesis in the adult rat. J Steroid Biochem 1987;28:421e7.
- [14] Joseph AA, Kind FA. Neonatal sterilization of rodents with steroid hormones: a note on the influence of neonatal treatment with estradiol benzoate or testosterone propionate on steroid metabolism in the brain and testes of adult male rats. J Steroid Biochem 1974;5:227e31.
- [15] Barañao JL, Chemes HE, Tesone M, Chiauzzi VA, Scacchi P, Calvo JC, Faigon MR, Moguilevsky JA, Charreau EH, Calandra RS. Effects of androgen treatment of the neonate on rat testis and sex accessory organs. Biol Reprod 1981;25: 851e8.
- [16] Ventanas J, López-Bote CJ, García C. Further signs of postnatal sexual differentiation in pigs. Exp Clin Endocrinol 1992;99:119e22.
- [17] Clark SG, Ceccre TE, Krisher RL. Effects of a depot progestin on spermatogenesis in postnatal pigs. Clin. Theriogenol. 2012;3:399 [abstract]].
- [18] Jean-Faucher C, Berger M, Gallon C, De Turckheim, Veyssiere G, Jean C. Longterm alterations on the male mouse genital tract associated with neonatal exposure to cyproterone acetate biochemical data. J Steroid Biochem 1989;32: 105e12.
- [19] Jean-Faucher C, Berger M, De Turckheim, Veyssiere G, Jean C. Permanent changes in the functional development of accessory sex organs and in fertility in male mice after neonatal exposure to cyproterone acetate. J Endocrinol 1985;104:113e20.
- [20] Diamond M, Llacuna A, Wong CL. Sex behavior after neonatal progesterone, testosterone, estrogen, or antiandrogens. Horm Behav 1973;4:73e88.
- [21] Hull EM. Effects of neonatal exposure to progesterone on sexual behavior of male and female rats. Physiol Behav 1981;26:401e5.
- [22] Barraclough CA. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. Endocrinology 1961;68:62e7.
- [23] Romagnoli S, Concannon PW. Clinical use of progestins in bitches and queens: a Review. In: Concannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C, editors. Recent advances in small animal reproduction. International Veterinary Service, University of Cornell; 2003. http://www.ivis.org/.
- [24] Johnston S, Root-Kustritz M, Olson P. The feline estrous cycle. In: Canine and feline theriogenology. Philadelphia: Saunders WB; 2001. p. 396e440.
- [25] Brown J, Wakter S, Steinman K. Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non domestic species. Conservation and research center. USA: Smithsonian's National Zoological Park Virginia; 2008. p. 62.
- [26] Faya M, Carranza A, Miotti R, Ponchón T, Furlan P, Gobello C. Fecal estradiol 17-b and testosterone in prepubertal domestic cats. Theriogenology 2013;80: 584e6.
- [27] Boothe H. Testes and epididymies. In: Slatter D, editor. Textbook of small animal surgery. Philadelphia: Saunders RW; 1993. p. 1331e5.
- [28] Lin C, Huang W, Chen K. Measurement of testicular volume in smaller testes: how accurate is the conventional orchidometer? J Androl 2009;30:685e9.
- [29] França LR, Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). Biol Reprod 2003;68(5):1554e61.
- [30] Valiente C, Arauz S, De la Sota P, Gobello C. Ejaculation training, seminal alkaline phosphatase and preservation through cooling in a milk-based extender in domestic cats. J Feline Med Surg 2014;16:312e6.
- [31] Bancroft JD, Stevens A. Theory and practice of histological techniques. Edinburgh, London, Melbourne New York: Churchill Livingstone; 1990. p. 34.
- [32] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162(1):156e9.
- [33] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265e75.
- [34] Faya M, Marchetti C, Priotto M, Grisolía M, D'Francisco F, Gobello C. Postponement of canine puberty by neonatal administration of a long term release GnRH superagonist. Theriogenology 2018;118:190e5.
- [35] Vidal JD, Whitney KM. Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity. Spermatogenesis 2014;3:979099.
- [36] Russell LD, Peterson RN. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. J Reprod Fertil 1984;70:635e64.
- [37] Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Kenan Q. J Clin Endocrinol Metab 1995;80:3689e98.
- [38] Denef C, de Moor P. The "puberty" of the rat liver. II. Permanent changes in steroid metabolizing enzymes after treatment with a single injection of testosterone propionate at birth. Endocrinology 1968;83:791e8.
- [39] Abney TO. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. Steroids 1999;64:610e7.
- [40] Serdar E. Aromatase deficiency. Fertil Steril 2014;101:323e9.