

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de  
DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**ESTUDIOS DE PROLACTINA EN EL MACHO Y CLINICO-ENDOCRINOLÓGICOS CON  
AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS Y ANTIPROGESTÁGENOS EN LA HEMBRA CANINA**

**AUTOR: CORRADA Yanina Alejandra, MV**

**DIRECTORA: GOBELLO Cristina, DMV, DECAR**

**LUGARES DE TRABAJO**

- Servicio de Diagnóstico por Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.
- Cátedra de Inmunología, 1ra Parte, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

**MIEMBROS DEL JURADO**

- Prof. Dra. CÓNSOLE, Gloria
- Prof. Dr. GIMENO, Eduardo Juan
- Prof. Dr. MARQUEZ, Adrián

**AÑO: 2004**

## **DEDICATORIA**

*A mi Familia:*

*A quien con incansable paciencia y buen humor me brindó su apoyo incondicional:*

*A mi Mamá*

*Y a quienes desde donde quiera que estén me dieron las fuerzas para no claudicar:*

*A Matías, a mi Tío y a mi Papá*

## AGRADECIMIENTOS

- Deseo agradecer en primer lugar y muy especialmente a la Dra Cristina Gobello quien orientó con gran Calidad, Dedicación, Conducta Ética y Profunda Moral mi interés por la investigación científica.
- También a los Méd. Vet. Raúl R. Rodríguez y Liliana Klima del Servicio de Diagnóstico por Imágenes de esta Facultad por su invalorable apoyo y ayuda en la realización de la totalidad de las ecografías incluidas en esta Tesis, sin la cual dichos estudios no podrían haberse materializado. Asimismo, por la calidez humana que siempre demostraron lo que me permitió trabajar en un ámbito de profunda cordialidad.
- A los Méd Vet Daniel Arias, Miriam Villanueva y Eduardo R. Pons de los Servicios de Cardiología y Diagnóstico por Imágenes de esta Facultad por haberme permitido apoyar en ellos, y brindarme todo cuanto estuvo a su alcance para sortear cualquier dificultad.
- Al Dr. Rodolfo Goya, Investigador del CONICET, quien como Investigador básico enriqueció mi visión científica. Asimismo por facilitarme la utilización de su laboratorio, aparatos, programas científicos y contador de emisiones gamma para realizar algunas de las determinaciones hormonales llevadas a cabo.
- A la Sra. Yolanda Sosa, perteneciente al Instituto INIBOLP por su colaboración y guía en algunas de las tareas de laboratorio requeridas en parte de los experimentos.
- A la Lic. Virginia Mariani del Laboratorio de Endocrinología del Centro de Referencia Bioquímico de La Plata, dependiente del Colegio de Bioquímicos, quien de manera idónea y totalmente desinteresada, me brindó sus conocimientos y facilitó material con la finalidad de introducirme con gran profesionalismo en el área del conocimiento de los inmunométodos.
- Al Dr Humberto Tramezzani y al Méd Vet Gonzalo Mareco por el reconocimiento de nuestra tarea en investigación canina y consecuente donación de parte de los perros de la colonia experimental incluidos en algunos de los estudios.

- A la Méd. Vet. Analía Humbert-Lan, Docente de la Cátedra de Semiología de esta Facultad, por haber estado siempre presente y dispuesta a brindar su ayuda para avanzar en mis tareas y experimentos de esta Tesis.
- Al Dr Hans Kooistra de la Universidad de Utrecht, Holanda por su valiosa y desinteresada colaboración con el uso del programa estadístico Pulsar® utilizado en el análisis de un experimento de esta Tesis.
- Al criadero “*Los Cinco Montes*” por proveer parte de los perros utilizados en algunos experimentos, y al criadero “*Carcassonne*” por igual motivo.
- Al Bioterista Eduardo Spaini por su paciencia y apoyo a nuestro trabajo, y por facilitar la utilización de algunos de los perros Beagle de su criadero en parte de los estudios de esta Tesis.
- Al Laboratorio Sandoz (Argentina) por la provisión de la bromocriptina a la Dra Cristina Gobello para la realización de esta Tesis.
- Al Laboratorio CEVA-VETEM (Francia) y CEVA (Italia) por la provisión de la suspensión de cabergolina a la Dra Cristina Gobello.
- Al Laboratorio Virbac (Francia) por la provisión de la suspensión de Alizine® y apoyo económico a la Dra Cristina Gobello que permitieron la realización de esta Tesis.
- Al Laboratorio Schering Plough (Argentina) por la provisión de la solución de Estrumate ® a la Dra Cristina Gobello.
- Al laboratorio Pfizer (Argentina) por la provisión de los antibiótico Clavamox® (comprimidos) y Clamoxyl L.A.® (solución inyectable) a la Dra Cristina Gobello.
- A la Empresa Iam’s y al laboratorio Holliday por la provisión de alimento balanceado para los animales incluidos en algunos de los experimentos.

- **A todos los Colegas y propietarios que confiaron en mi y me permitieron incluir a sus pacientes y mascotas en los experimentos de esta Tesis.**
- **A lo dificultoso y a lo no sencillo, porque me hizo crecer.**
- **A todos mis amigos.**
- **A mis pacientes caninos, sin ellos nada de lo anteriormente dicho tendría sentido.**

## PRÓLOGO

*Nuestra Recompensa se encuentra  
en el Esfuerzo más allá del Resultado  
Un Esfuerzo Total es una Victoria Completa  
M Gandhi*

El presente trabajo de Tesis representa el fruto de un periodo de enorme trabajo conjunto y multidisciplinario, realizado con entusiasmo y dedicación con la finalidad de esclarecer puntos poco estudiados de la reproducción en los caninos domésticos. Esta Tesis incluye una parte de experimentos básicos realizados en caninos machos, que intenta sentar las bases para posteriores estudios aplicados a fin de permitir una mejora significativa en la eficiencia reproductiva en este género.

También consta de ensayos aplicados llevados a cabo en la hembra canina, sexo en que los aspectos básicos se encuentran mayoritariamente estudiados. Por este motivo, en la perra la autora ha avanzado en la puesta a punto de protocolos terapéuticos nuevos para mejorar la eficiencia reproductiva.

La escritura ha sido ordenada en Capítulos a fin de aportar mayor organización y claridad que redunde en una lectura amena por parte del lector. Cada capítulo representa experimentos independientes. Se ha obviado la descripción detallada de técnicas y hallazgos rutinarios de metodologías ya reportadas en la literatura. Por el contrario, se describen con minuciosidad técnicas o conceptos originales.

Se puede decir que el auge que ha tenido la cría de perros de raza en los últimos años hace imperiosa la necesidad de disponer estudios novedosos en reproducción canina. La autora confía profundamente en que esta obra cumplirá con tales expectativas, y resultará una guía de ayuda para numerosos estudiantes y Colegas Veterinarios.

**PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS****CAPÍTULO I**

- CORRADA, Y.; MARECCO, G.; RIMOLDI, I.; ARRESEIGOR, S.; GOBELLO, C. (2004). Prolactin Reference Range and Pulsatility in Male Dogs. 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. San Pablo, Brasil (enviado).
- CORRADA, Y.; RUBE, A.; TORTORA, M.; GOBELLO, C. (2003). Prolactin Reference Range in Male Dogs. Simposio Anual de la European Society of Small Animal Reproduction. Dublin, Irlanda. 110.

**CAPÍTULO II**

- CORRADA, Y.; CASTEX, G.; SOSA, Y.; GOBELLO, C. (2003). Secretary Patterns of Prolactin in Dogs: Circannual and Ultradian Rhythms. *Reprod Dom Anim.* 38 (3): 219-223.
- CORRADA, Y.; CASTEX, G.; GOBELLO, C. (2002). Circannual Prolactin Secretary Patterns in Intact Dogs in the Southern Hemisphere. Simposio Anual de la European Society of Small Animal Reproduction. Liege, Bélgica.

**CAPÍTULO III**

- CORRADA, Y.; MARECCO, G.; RIMOLDI, I.; ARRESEIGOR, S.; GOBELLO, C. (2004). Prolactin Reference Range and Pulsatility in Male Dogs. 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. San Pablo, Brasil (enviado).

- CORRADA, Y.; CASTEX, G.; DE LA SOTA, L.; GOYA, R.; GOBELLO, C. (2001). Prolactin Pulsatile Secretion Patterns in Male Dogs and Anestrous Bitches. Simposio Anual de la European Society of Small Animal Reproduction. Milán, Italia. Pp 133-134.

#### **CAPÍTULO IV**

- GOBELLO, C.; CASTEX, G.; BROGLIA, G.; CORRADA, Y. (2003). Coat Color Changes Associated with Cabergoline in Bitches: Possible Involvement of MSH. J Small Anim Pract 44 (8); 352-354.
- CORRADA, Y.; CASTEX, G.; BALLABIO, R.; GOBELLO, C. (2001). Shortening of Interestrus Intervals with Cabergoline in the Bitch. Simposio Anual de la European Society of Small Animal Reproduction. Milán, Italia. Pp 137-138.
- CORRADA, Y.; GOBELLO, C. (2001). Estrus Induction with Dopaminergic Agonists in the Bitch: A Review. Communications in Theriogenology. 1 (1). Doc 2.
- GOBELLO, C.; CASTEX, G.; DE LA SOTA, L. CORRADA, Y. (2004). Shortening of the Interestrus Intervals with Cabergoline in Bitches: A Clinical Trial. J Am Anim Hosp Assoc. 40 (2): 115-119.

#### **CAPÍTULO V**

- GOBELLO, C.; CASTEX, G.; CORRADA, Y.; KLIMA, L.; DE LA SOTA, L.; RODRÍGUEZ, R. (2002). Use of Prostaglandins and Bromocriptine Mesylate for Pregnancy Termination in Bitches. J Am Vet Med Assoc. 220 (11): 1017-1019.

## CAPÍTULO VI

- CORRADA, Y.; GARCÍA, P.; RODRÍGUEZ, R.; ARIAS, D.; GOBELLO, C. (2003). Interrupción de la Gestación en la Perra con el Antiprogestágeno, RU 534. 3as Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica de Pequeños, Grandes Animales y Bromatología. Colegio de la Provincia de Buenos Aires. Mar del Plata, Argentina.

## CAPÍTULO VII

- CORRADA, Y.; ARIAS, D.; RODRÍGUEZ, R.; MUCHA, C.; WANKE, M.; GOBELLO, C. (2003). Una combinación de aglepristone y cloprostenol en el tratamiento de la piómetra cerrada canina. *Revista Investigación Veterinaria, UBA.* 5 (1): 128.
- CORRADA, Y.; ARIAS, D.; RODRÍGUEZ, R.; MUCHA, C.; WANKE, M.; GOBELLO, C. (2003). Una combinación de aglepristone y cloprostenol en el tratamiento de la piómetra cerrada canina. *Primeras Jornadas de la UBA.*
- GOBELLO, C.; CASTEX, G.; KLIMA, L.; RODRIGUEZ, R.; CORRADA, Y. (2003). A Study of Two Combined Protocols of Aglepristone and Cloprostenol to Treat of Open Cervix Pyometra in the Bitch. *Theriogenology.* 30:901-908.
- CORRADA, Y.; CASTEX, G.; KLIMA, L.; RODRÍGUEZ, R.; GIANNONI, M.; GOBELLO, C. (2002). A Study of two Combined Protocols of Aglepristone and Cloprostenol to Treat of Open Cervix Pyometra in the Bitch. *Simposio Anual de la European Society of Small Animal Reproduction.* Liege, Bélgica.

**ABREVIATURAS**

**ANOVA:** análisis de varianza

**AUC:** área bajo la curva

**CV:** coeficiente de variación

**HEQ-P:** hiperplasia endometrial quística/piómetra

**IIE:** intervalo interestro

**Kg:** kilogramo

**LH:** hormona luteinizante

**P4:** progesterona

**PRL:** prolactina

**RIA:** radioinmunoensayo

**rpm:** revoluciones por minuto

**SC:** subcutánea

**SD:** desvío estándar

**SEM:** error estándar de la media

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	3
<b>CAPÍTULO I</b>	
<i>Rango de referencia de prolactina sérica en el macho canino</i> .....	7
<b>CAPÍTULO II</b>	
<i>Estudios de los patrones de secreción circanual de prolactina sérica en el macho canino</i> .....	13
<b>CAPÍTULO III</b>	
<i>Estudio de los patrones de secreción ultradianos de prolactina sérica en el macho canino</i> .....	20
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<i>Inducción de ciclos estrales en la perra con el agonista dopaminérgico cabergolina</i> .....	26
<b>CAPÍTULO V</b>	
<i>Estudio endocrinológico y clínico comparativo de protocolos combinados con agonistas dopaminérgicos y prostaglandinas en la interrupción de la gestación no deseada en la perra</i> .....	35
<b>CAPÍTULO VI</b>	
<i>Estudio endocrinológico y clínico del antiprogestágeno aglepristone para la terminación de la gestación no deseada en la perra</i> .....	43
<b>CAPÍTULO VII</b>	
<i>Estudio endocrinológico y clínico con aglepristone y cloprostenol en el tratamiento médico de la piómetra canina</i> .....	51
<b>CONCLUSIONES FINALES</b> .....	61

## **ESTUDIOS DE PROLACTINA EN EL MACHO Y CLINICO-ENDOCRINOLÓGICOS CON AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS Y ANTIPROGESTÁGENOS EN LA HEMBRA CANINA**

**Palabras clave:** canino- prolactina- agonista dopaminérgico- antiprogéstágeno

### **RESUMEN**

Los estudios de endocrinología reproductiva básica del macho canino han sido menos desarrollados que en su contraparte femenina. Ejemplifica esto la escasa información existente en prolactina (PRL) sérica en este sexo. Contrariamente, en la hembra canina la endocrinología reproductiva ha sido descrita en gran parte, siendo posible la realización de estudios aplicados para el mejoramiento y control de la reproducción. Acorde a lo anteriormente expuesto los objetivos de esta Tesis fueron: establecer el rango de referencia y describir los patrones de secreción circanual y ultradiano de PRL sérica en el macho canino. En la hembra canina estudiar, con ensayos controlados de distribución al azar, la eficacia y seguridad de la cabergolina en la inducción de ciclos estrales fértiles, de protocolos combinados de bromocriptina y prostaglandinas (PG) para interrumpir la gestación, como así también del antiprogéstágeno, aglepristone, para este último propósito y en el tratamiento médico de la hiperplasia endometrial quística piómetra. Adicionalmente, describir el perfil sérico de progesterona ( $P_4$ ) y las variaciones de la temperatura rectal durante estos dos últimos protocolos. El rango de referencia de PRL sérica en el perro se estableció desde valores no detectables hasta 6.0 ng/ml, asimismo se demostró la existencia y se describió un patrón de secreción circanual y pulsátil para esta hormona. En perras, resultó efectivo y seguro el protocolo con cabergolina para la inducción de ciclos estrales fértiles y el acortamiento de los intervalos interestro. La combinación de bromocriptina y PG tuvo una efectividad y seguridad del 100% en la interrupción de la gestación indeseada. En tanto, el aglepristone también resultó igualmente seguro y eficaz en los protocolos utilizados, encontrándose la temperatura rectal como un parámetro de utilidad para el monitoreo clínico del protocolo de interrupción de la gestación mientras que la  $P_4$  no presentó variaciones significativas durante los mismos.

## **PROLACTIN STUDY IN THE MALE AND CLINICAL-ENDOCRINOLOGICAL STUDIES WITH DOPAMINERGIC AGONISTS AND ANTIPROGESTINS IN THE FEMALE DOG**

**Key words:** canine- prolactin- dopaminergic agonist- antiprogesterin

### **SUMMARY**

In male dogs basic endocrine studies have been not fully developed as it was in its female counterpart e.g. very little information is available on serum prolactin (PRL) in this gender. Conversely, in the female dog most of the sexual endocrinology has been fully described, being possible to carry out applied trials to control and improve reproduction. Thus, the objectives of this Thesis were: to establish serum PRL reference range and to describe the circannual and circadian rhythms of secretion of this hormone in male dogs. In the bitch, to test by randomized controlled studies the efficiency and safety of the dopaminergic agonist, cabergoline, in estrous induction, combined protocols of bromocriptine and prostaglandins (PG) to terminate unwanted pregnancy and for this same purpose the antiprogesterin, aglepristone. A combination of aglepristone and PG for the medical treatment of cystic endometrial hyperplasia pyometra was also tested. Additionally, to describe progesterone (P<sub>4</sub>) serum concentrations and body temperature during these last two protocols. Prolactin reference range for male dogs was established from non detectable values to 6.0 ng/ml, a circannual and pulsatile pattern of secretion was also described in this gender. In the bitch, cabergoline showed to be safe and efficient for estrous induction and shortening of the interestrous intervals. The combination of the dopaminergic agonist, bromocriptine, and PG resulted 100% safe and efficient in pregnancy termination. Furthermore, aglepristone, was equally successful in the protocols used, being body temperature a good parameter for clinical assessment of treatment. Conversely, P<sub>4</sub> did not have significant variations throughout the protocols.

## INTRODUCCIÓN GENERAL



La cría de perros de raza es una actividad en pleno crecimiento mundialmente. Surge con ello la necesidad de encontrar técnicas y protocolos terapéuticos innovadores que garanticen un incremento en la eficiencia reproductiva acorde a las demandas del mercado. Nuestro país no se halla ajeno a ello, y es así que el número de criaderos de razas puras ha ascendido significativamente en nuestro medio, constituyéndose de este modo, en un área de producción animal de rentabilidad probada tanto en grandes ciudades como en zonas semi- rurales.

Como contrapartida, la población exacta de perros vagabundos en la Argentina no es bien conocida, sin embargo se estima que asciende a más de 5 millones, siendo insuficiente el control de la sobrepoblación de caninos con o sin propietario, representando un grave problema sanitario y social (1, 7, 9). Asimismo, debido a que esto también es un problema mundial, se está trabajando activamente en contracepción en esta especie en el ámbito internacional (2). No obstante, no existen aún tecnologías prácticas, económicas, seguras y eficaces para tal fin (2).

Tanto para el mejoramiento de la eficiencia como para el control de la actividad reproductiva resulta esencial el conocimiento de la fisiología reproductiva de esta especie. Los estudios de la endocrinología reproductiva del macho canino han sido mucho menos desarrollados que en su contraparte femenina y restan aún por describir aspectos básicos de la misma. Ejemplifica lo anteriormente expuesto la escasa información existente de la hormona prolactina (PRL) en este sexo.

La PRL es una hormona peptídica producida por la adenohipófisis que tiene relevancia reproductiva en los carnívoros. En los caninos no domésticos, la disminución de PRL durante el invierno quita el bloqueo de las funciones gonadotróficas e induce el estro y el parto 2 meses más tarde (8). Por lo tanto, el período de cría de la camada coincide con la máxima producción de PRL en ambos sexos. La PRL también disminuye las tensiones sociales dentro de la jauría y asegura el cuidado de los cachorros, tanto por las hembras como por los machos (8). Si bien existe evidencia de que la PRL puede inducir comportamiento paterno en los lobos (3), los perros domésticos no mantienen dicho comportamiento. Sin embargo, se cree que podrían existir ritmos estacionales de PRL que influencien la agresividad o la sumisión en los perros machos.

Contrariamente, en la hembra canina la endocrinología reproductiva básica ha sido descrita en gran parte, posibilitando la realización de estudios aplicados para el mejoramiento y control de la reproducción. Queda pendiente aún la puesta a punto y la descripción de los mecanismos endocrinológicos de acción de diversos protocolos terapéuticos que permitan arribar a estos propósitos. Ejemplos de protocolos que contribuyan al mejoramiento y control reproductivo en la perra incluyen los de inducción de ciclos estrales, interrupción de gestación no deseada y tratamiento médico de piómetra.

La inducción farmacológica de ciclos estrales fértiles representa fundamentalmente una importante necesidad de mercado debido al normalmente largo período de interestro de esta especie (5). Los períodos sin camadas de cachorros disponibles para la venta resultan, frecuentemente, antieconómicos para el criador. De este modo, la posibilidad de inducción de ciclos estrales en una época favorable para la venta resultaría útil, marcando de este modo la diferencia entre un manejo rentable de otro que no lo es. Además, la inducción de estros fértiles resulta imprescindible cuando se desea emplear técnicas de reproducción asistida. Sin embargo, la inducción de ciclos estrales no se ha difundido ampliamente en esta especie por la escasa eficacia de la mayoría de los protocolos hormonales propuestos hasta el momento.

El complejo hiperplasia endometrial quística piómetra es una grave enfermedad progesterona-dependiente del útero de la perra, que representa una gran amenaza en hembras empleadas para la cría. El tratamiento tradicional de esta entidad es quirúrgico mediante ovariectomía. Este procedimiento señala indefectiblemente, el final de la vida reproductiva de la hembra, situación especialmente frustrante cuando se trata de una perra reproductora. Surge así la necesidad de poner a punto y conocer el mecanismo de acción de tratamientos médicos eficaces, que permitan evitar la cirugía en hembras de elevado valor genético que padezcan tal enfermedad, preservando así su potencial como reproductoras.

La terminación de la gestación no deseada es, en la perra, un problema frecuente de la clínica veterinaria diaria. Asimismo constituye una forma de prevenir la reproducción descontrolada en hembras de refugio o callejeras en las que no se han usado otros métodos contraceptivos oportunamente (6). La interrupción farmacológica de la gestación convencional con estrógenos, si bien ha sido lamentablemente muy utilizada, por sus efectos colaterales no ha tenido una gran aceptación en medicina veterinaria (4). Con ello surge la necesidad de poner a punto y conocer el mecanismo de acción de un protocolo efectivo y seguro, que conserve el potencial reproductivo de la hembra intacto y desde luego no comprometa su salud general.

Con el convencimiento de la necesidad de contribuir al esclarecimiento de la problemática anteriormente expuesta, los objetivos generales del presente trabajo de Tesis incluyeron los enumerados a continuación:

- Establecer perfiles séricos de PRL en caninos machos
- Evaluar, clínica y endocrinológicamente nuevos protocolos terapéuticos para el control y el mejoramiento reproductivo en los caninos hembras

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. AGOSTINI, A.; TRINIDAD, J.; CORNERO, F.; TELLECHEA, D.; LÓPEZ, C. (1999) Población animal en una comunidad con necesidades básicas insatisfechas. *Revista de Medicina Veterinaria*. 81 (1): 47-50.
2. Alliance for Contraception in Cats and Dogs. (2002) Proceeding book of the International Symposium of non surgical methods for pet population control. Georgia, EE.UU. 110.
3. ASA, C.S. (1996) Hormonal and experimental factors in the expression of social and parenteral behavior in canids. En: FRENCH, J.A.; SOLOMON, A. (eds), *Cooperative Breeding in Mammals*. Cambridge University Press, Cambridge. 129-149.
4. BOWEN, R.A.; OLSON, P.N.; BEHRENDT, M.D.; WHEELER, S.L.; HUSTED, P.W.; NETT, T.M. (1985) Efficacy and toxicity of estrogens commonly used to terminate canine pregnancy. *J Am Vet Med Assoc*. 186: 783-788.
5. FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. (1996) Ovarian cycle and vaginal cytology. En: *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders. 526-546.
6. GOBELLO, C. (1992) Control de la reproducción en la perra y en la gata. *Veterinaria Argentina*. 11 (90): 322-333.
7. GONZÁLEZ, O.; MANCHINI, S.M. (1997) Demografía canina y felina en municipios del Gran Buenos Aires. Segundo Congreso Argentino de zoonosis y primer Congreso Argentino y latinoamericano de enfermedades emergentes.
8. KREEGER, T.J.; SEAL, U.S. (1992) Circannual prolactin rhythm in intact dogs housed outdoors. *Chronobiologia*. 19: 1-8.

9. MALIANDI, F.; GONZÁLEZ, O.; BONZO, E.; BETTINA, G. (1995) Demografía canina y felina en la ciudad de Chascomús. Relevamiento demográfico de animales domésticos en la ciudad de Buenos Aires. 149.

## CAPÍTULO I



### RANGO DE REFERENCIA DE PROLACTINA SÉRICA EN EL MACHO CANINO

#### **Introducción**

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica producida por las células lactotropas de la glándula pituitaria anterior. Aunque se han propuesto muchas funciones reproductivas en los carnívoros de ambos sexos (7) es escasa la información sobre PRL en perros machos. En los testículos, el ARNm del receptor de PRL se expresa no solamente en las células de Leydig sino que también lo hace en la primera capa del epitelio seminífero (9), sugiriendo que la secreción de PRL puede afectar directamente la esteroidogénesis y la espermatogénesis. Se sabe que en el hombre la hiperproducción patológica de PRL inhibe la función testicular gonadal y endócrina (11). En el perro la administración de PRL una vez por semana durante 6 meses ocasionó azoospermia reversible (12). En los machos caninos, esta hormona puede también tener un papel facilitador de la hiperplasia prostática inducida por esteroides (16) y en lobos la PRL induce el comportamiento paterno (1). Los perros domésticos, parecen no conservar dicho comportamiento, pero se cree que la agresividad o la sumisión puede estar influenciada por la PRL (4).

Se desconoce el rango de referencia normal de PRL sérica en perros machos y la mayoría de lo descrito sobre esta hormona en la especie canina, fue realizado en perras (3, 5, 6, 15).

Para la evaluación clínica y experimental es importante conocer el rango de referencia en este sexo, sirviendo como parámetro de normalidad (2). De lo anteriormente expuesto, surgió el objetivo específico de este capítulo que consistió en establecer el rango de referencia de PRL sérica en los caninos machos.

## **Materiales y Métodos**

### *Animales*

Sesenta y cinco caninos machos, enteros, mestizos y de raza (11 Beagles y 41 Ovejero Alemán) de  $5 \pm 2.1$  años y 10 a 35 kg se incluyeron en este estudio. Todos los perros poseían dueño, estaban sanos y vivían en un hábitat mixto externo e interno. Todos los propietarios firmaron un consentimiento para incluir a sus perros en el estudio.

### *Muestreo sanguíneo*

Las muestras sanguíneas para la determinación de PRL sérica fueron tomadas durante los meses de agosto y de septiembre en el domicilio de los animales por venopunción periférica directa (cefálica/ safena/ yugular) con el menor estrés posible.

### *Ensayo hormonal*

La PRL sérica fue determinada por un análisis enzimo inmunométrico (Milenia, DPC®, Bad Nauheim, Alemania) el cual fue previamente validado (8). Los coeficientes de variación (CV) *intra e inter* ensayo fueron de 5.3 y 8.7, respectivamente. El límite más bajo de detección al 95% de unión (sensibilidad) fue de 0.4 ng/ml.

### *Análisis estadístico*

Se realizó una estadística descriptiva para las concentraciones de PRL sérica ( $n = 68$ ; ng/ml) y se calculó el rango de referencia como la media  $\pm 2$  SD (2). Los valores de PRL de los perros fueron analizados por ANOVA. El modelo matemático incluyó los efectos principales de la raza (Beagle- Ovejero Alemán- mestizo) y de la edad (joven [ $\leq 2$  años de edad] - adulto [ $> 2$  y  $\leq 7$  años de edad] - viejo [ $> 7$  años de edad]). Adicionalmente se realizaron contrastes ortogonales para probar diferencias entre las razas y grupos de edad. Para una mayor descripción de los datos, se hizo un análisis de correlación entre la edad de los perros (años) y las concentraciones de PRL (ng/ml).

## **Resultados**

La concentración de PRL sérica (media±SD) en la totalidad de los animales estudiados (n=65) fue de 2.7±0.2 ng/ml, estableciéndose el rango de referencia para esta hormona desde valores no detectables hasta 6.0 ng/ml. Se hallaron diferencias significativas entre las 3 razas, siendo las concentraciones séricas de PRL en los perros Beagle estadísticamente más altas que en los mestizos y los Ovejero Alemán ( $p < 0.05$ , Figura 1). El efecto de la edad no fue significativo en este grupo de animales y no se encontró tampoco correlación significativa entre las concentraciones séricas de PRL y la edad de los animales.

## **Discusión**

La proporción de razas incluidas en el estudio fue representativa de la distribución de la población canina de nuestro país, en donde el Ovejero Alemán y los mestizos se encuentran entre los perros más numerosos en la práctica clínica, mientras que los Beagles tienen relevancia experimental mundialmente. Por lo tanto, se garantiza la extrapolación de los resultados aquí obtenidos a condiciones clínicas y experimentales.

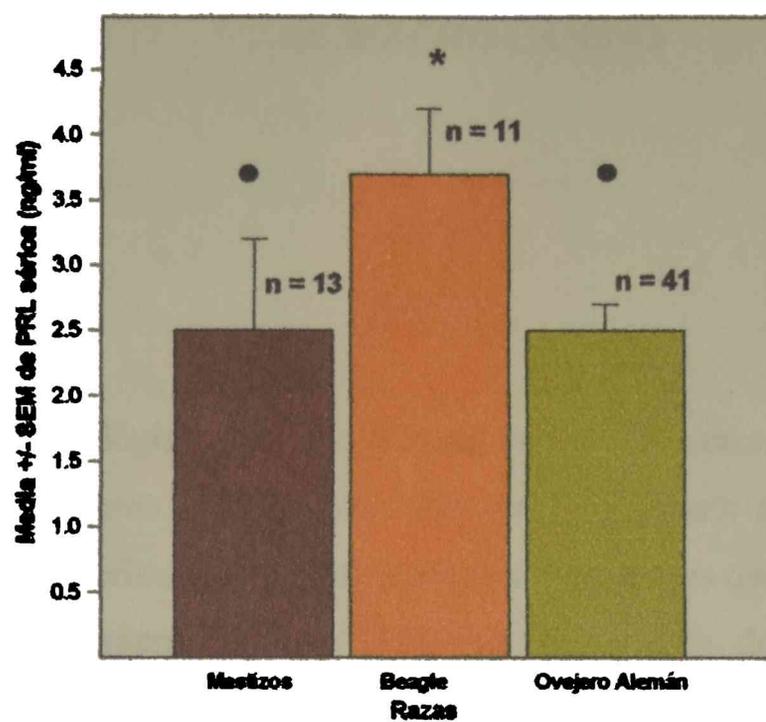
Los valores medios de PRL sérica fueron más bajos que los ya reportados en perros machos (6, 12). Estas diferencias pueden ser debidas al ensayo usado o a la genética de los animales. Las diferencias en las concentraciones de PRL plasmática son bien conocidas entre cepas de ratones (13, 14).

En un estudio previo, en el cual se usaron cuarenta y nueve perros machos de diferentes razas y edades, no se halló ningún cambio relacionado con la edad para las concentraciones séricas de estradiol, de testosterona ni de gonadotrofinas (10). De acuerdo a los resultados del presente estudio, la misma situación parecería ser valedera también para la PRL en este sexo. Asimismo, se hallaron diferencias significativas entre las razas empleadas, de lo que se desprende que se debe tener precaución al extrapolar los resultados de PRL sérica entre los caninos machos de las diferentes razas.

## **Bibliografía**

1. ASA, C.S. (1996) Hormonal and experimental factors in the expression of social and parenteral behavior in canids. En: FRENCH, J.A.; SOLOMON, A. (eds), *Cooperative Breeding in Mammals*. Cambridge University Press, Cambridge. 129-149.
2. CAMPELL, M.J.; MACHIN, D. (1993) *Medical statistics. A common sense Approach*. 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd. UK. 190.
3. GOBELLO, C.; DE LA SOTA, L.; GOYA, R. (2001) Twenty four hour prolactin and LH in crossbred anestrus bitches. *Reprod. Dom. Anim.* 36, 41-45.
4. JOCHLE, W. (1997) Prolactin in canine and feline reproduction. *Reprod Dom Anim.* 32, 183-193.
5. KOOISTRA, H. (2000) Adenohypophyseal function in healthy dogs and dogs with pituitary disease. Tesis PhD. Universidad de Utrecht, Holanda. 247.
6. KREEGER, T.J. SEAL, U.S. (1992) Circannual prolactin rhythm in intact dogs housed out doors. *Chronobiologia.* 19 (1-2): 1-8.
7. MANN, T.; LUTWART-MANN, C. (1981) Male reproductive function and semen. En: *Themes and trends in physiology biochemistry and investigative andrology*. Springer- verlag, Berlin, Heidelberg, New York. Pp 48-54.
8. ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. (1997) In vivo investigation of luteal function in dogs: effect of cabergoline and prolactin on progesterone secretion in mid pregnancy and diestrus. *Reprod Dom Anim.* 14: 25-38.
9. OUHTIT, A.; MOREL, G.; KELLY, P.A. (1993) Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in rats reproductive tissues. *Biol Reprod.* 49: 528-536.
10. PETERS, M.A.J., DE JONG, F.H.; TEERDS, K.J.; DE ROOIJ, D.G.; DIELEMAN, S.J.; VAN SULJS, F.J. (2000) Aging testicular tumors and the pituitary – testis axis in dogs. *J Endocrinol.* 166: 153-161.
11. SEGAL, P.; POLISHUK, W.Z.; LAUFER, N.; BEN, D.M. (1987) Male hyperprolactinemia: effects on fertility. *Fertil Steril.* 32: 556-561.
12. SHAFIK, A. (1994) Prolactin injection, a new contraceptive method: experimental study. *Contraception.* 50: 191-199.
13. SINHA, Y.N.; SALOCKS, C.B.; VANDERLAAN, W.P. (1975) Prolactin and growth hormone in different inbred strains of mice: patterns with estrous cycle, time of day and perphenazine stimulation *Endocrinology.* 97: 1112 –1122.

14. SINHA, Y.N.; VLAHAKIS. G.; VANDERLAAN, W.P. (1979) Plasma pituitary and urine concentrations of prolactin and growth hormone in eight strains of mice with varying incidence of mammary tumors. *Int J Cancer*. 24: 430-437.
15. STEINETZ, B.G.; GOLDSMITH, L.T.; HASAN, S.H.; LUST, G. (1990) Diurnal variation of progesterone, but not relaxin, prolactin, or estradiol-17 beta in the pregnant bitch. *Endocrinology*. 127: 1057-1063.
16. SURIYASATHAPORN-MAHAPOKAI, W. (2000) Hormonally induced benign prostatic hyperplasia in the Dog. PhD thesis Diss. Utrecht 104.
17. TAHA, M.B.; NOAKES, D.E.; ALLEN, W.E. (1981) The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen. *J Sm Anim Prac*. 22: 177-181.



**Figura 1:** Concentración de PRL sérica media  $\pm$  SEM (ng/ml) de 65 perros machos enteros mestizos y de raza pura. Las barras sobre las columnas representan los valores de SD. Las concentraciones de PRL sérica en perros Beagles fueron significativamente diferentes de las de los mestizos y Ovejero Alemán ( $p < 0.05$ ), esto se indica en la figura con diferentes símbolos.

## CAPÍTULO II



### **ESTUDIO DE LOS PATRONES DE SECRECIÓN CIRCANUAL DE PROLACTINA SÉRICA EN EL MACHO CANINO**

#### **Introducción**

El estudio de los ritmos biológicos permite afirmar que los procesos fisiológicos sufren en el tiempo variaciones periódicas regulares y previsibles. No tener en cuenta estas variaciones considerando el tiempo, como dimensión experimental, significa obtener mediciones que sólo representen un promedio de valores con un amplio margen de error (16). En la mayoría de los vertebrados, las funciones neuroendócrinas se organizan en ciclos regulares de diversa periodicidad. Así, los ciclos de 12 meses se conocen con el nombre de ritmos circanales. Los patrones de secreción de las hormonas se regulan principalmente de manera endógena, aunque están también bajo influencia ambiental (2). La secreción de prolactina (PRL) está bajo el control inhibitorio tónico de neuronas dopaminérgicas hipotalámicas y la acción estimulante de los estrógenos, con un número de otras hormonas hipotalámicas desempeñando también un papel modulador (6, 19).

Las variaciones estacionales de temperatura y fotoperíodo tienen influencia en el ritmo circanual de las especies de reproducción estacional (4, 10, 12, 20). Así, un componente circanual de PRL fue descrito en 4 perros machos y 4 hembras mestizas que vivían al aire libre en un estudio realizado en el hemisferio norte (13). Desde un punto de vista práctico, el conocimiento del ritmo secretor de una hormona permite, como se dijo anteriormente, el asesoramiento correcto de la función endócrina. Así, las muestras apropiadamente obtenidas en los diversos meses del año pueden proporcionar indicadores dinámicos útiles de la función hipotálamo-pituitaria, tanto para la investigación como para la práctica clínica.

Por lo antedicho, el objetivo particular del presente capítulo consistió en describir en perros machos del hemisferio sur los patrones de secreción circanual de PRL sérica

## **Materiales y Métodos**

### *Animales*

Se incluyeron en este estudio seis perros machos sanos, enteros, mestizos, de 1 a 9 años de edad, de 10 a 35 kg. Los animales, vivían en caniles al aire libre por lo menos un año antes de que el estudio comenzara, se alimentaron con alimento comercial para perros, y disponían de agua *ad libitum*. Todos los animales fueron acostumbrados previamente al procedimiento de la toma de muestras sanguíneas.

### *Lugar geográfico*

El estudio fue realizado en la ciudad de la Plata (latitud 34° 55 ' Sur, longitud 57° 17' Oeste), 56 km Sur - Este de Buenos Aires, Argentina. La duración del día varía en aproximadamente 10 horas en invierno a 14 horas en verano. Durante los estudios los animales permanecieron en sus lugares habituales (caniles al aire libre).

### *Muestreo sanguíneo*

Las muestras sanguíneas para la determinación de PRL fueron colectadas entre las 10:00 horas y las 11:30 horas una vez por mes durante 1 año, desde el mes de diciembre hasta el mes de noviembre del siguiente año. Las muestras sanguíneas se colectaron con el mínimo estrés posible por venopunción periférica directa (safena/ cefálica/ yugular) y se centrifugaron a 4.000 rpm durante 15 minutos. El suero fue separado y almacenado a -20°C hasta el análisis hormonal.

### *Ensayo hormonal*

La PRL sérica fue determinada por un ensayo comercial homólogo enzimoimmunométrico que fue validado previamente (15). Los coeficiente de variación (CV) *intra* e *inter* ensayo fueron de 5.6 y 8.9, respectivamente. El límite más bajo de detección al 95% de binding (sensibilidad) fue de 0.5 ng/ml. Todas las muestras de cada animal fueron analizadas en una sola corrida para evitar la variación *inter* ensayo.

### *Análisis estadístico*

Los perfiles de PRL fueron analizados por ANOVA. El modelo matemático incluyó el efecto principal del mes y se analizaron también con el mismo modelo, los meses agrupados según su semejanza en la cantidad de horas luz del día (meses con mayor [noviembre, diciembre, y enero], menor [mayo, junio y julio] y media [febrero, marzo, abril] cantidad de horas de luz natural. Las concentraciones de PRL y el número de horas luz, fueron también analizados por correlación.

Los datos obtenidos fueron expresados como media  $\pm$  SEM y el nivel de significancia se fijó en  $p < 0.05$ .

### **Resultados**

Cuando todas las muestras fueron consideradas ( $n=72$ ) las concentraciones de PRL (media $\pm$ SEM) fueron de  $1.7 \pm 0.2$  ng/ml. Las concentraciones de PRL sérica no resultaron estadísticamente diferentes entre los distintos meses del año cuando se consideraron estos en forma individual. Sin embargo, los 3 meses con la mayor cantidad de horas luz (noviembre, diciembre, y enero) tuvieron concentraciones significativamente más altas de PRL que los 3 meses con la menor cantidad de horas luz (mayo, junio y julio) ( $2.31 \pm 0.37$  vs.  $0.96 \pm 0.37$ ,  $p < 0.01$ ; **Figura 1**). También una correlación baja aunque significativa, fue hallada entre la cantidad de horas luz y las concentraciones de PRL ( $0.24$ ,  $p < 0.05$ ; **Figura 2**).

### **Discusión**

En el presente estudio se encontró un ascenso de las concentraciones de PRL sérica con el aumento de las horas de luz hasta alcanzar valores pico en los meses de verano. Por otro lado, se hallaron las concentraciones más bajas para esta hormona en el otoño e invierno temprano.

Estos resultados hallados fueron opuestos en los meses del año a los encontrados en 4 perros machos (13) y en cánidos no domésticos (14) en el hemisferio norte. La diferencia leve encontrada en los meses de máxima PRL entre los hemisferios se podría explicar por las diferentes latitudes en estos dos estudios [45 Norte aproximadamente para el estudio de Kreeger (13, 14) vs. 35° Sur para el nuestro]. Así, como era esperado, un patrón estacional similar aunque opuesto en meses parece existir en ambos hemisferios.

En el perro doméstico la interacción exacta entre la PRL y el fotoperíodo no se conoce pero muy probablemente podría ocurrir que la secreción de melatonina por la glándula pineal en las horas de oscuridad inhiba la liberación de PRL por las vías dopaminérgicas (8). Así, la luz decreciente disminuye la secreción de PRL mientras que la luz creciente ocasionaría concentraciones máximas de esta hormona.

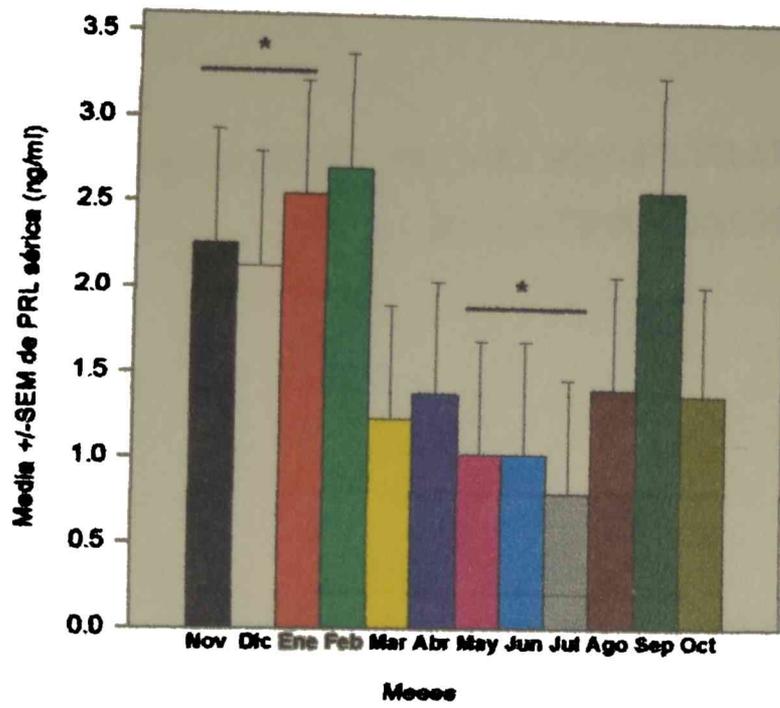
Los resultados de estudios sobre la reproducción en perros domésticos y el fotoperíodo son conflictivos. La estación y la duración de la luz del día no mostraron influencia en la incidencia del estro en 2 estudios (3, 17). Sin embargo, las perras que vivían en medio ambiente externo parecían mantener una cierta estacionalidad en el inicio del estro en un estudio posterior (7). Estrictamente, el control fotoperiódico del estro se ha demostrado claramente sólo en la raza Basenji (9). La estación del año también ha mostrado tener cierto efecto en la concentración de espermatozoides del eyaculado, con una concentración más baja hacia fines del verano (18). También en la secreción de hormona luteinizante y de testosterona en los perros machos (5).

La función de un ritmo circanual de PRL en perros es desconocida, siendo probable que el ritmo de PRL tenga cierto efecto en el apareamiento en esta especie (11). En especies de caninos no domésticos, la disminución de PRL durante el invierno quita el bloqueo de las funciones gonadotróficas e induce el estro y el parto 2 meses más tarde (14). Por lo tanto, el periodo de cria de camadas coincide con la máxima producción de PRL en ambos sexos. Esta hormona también disminuye las tensiones sociales dentro del grupo de animales y asegura el cuidado de los cachorros tanto por las hembras como por los machos (14). Si bien existe evidencia de que la PRL puede inducir comportamiento paterno en los lobos (1), los perros domésticos no mantienen este comportamiento paterno. El ritmo circanual de PRL en los caninos domésticos podría ser heredado del lobo aunque funcionalmente alterado con la domesticación. Permanece por dilucidar si estos ritmos estacionales de PRL influyen la agresividad o la sumisión en los perros machos. Se concluye que la PRL tiene una ritmicidad circanual en perros machos del hemisferio sur.

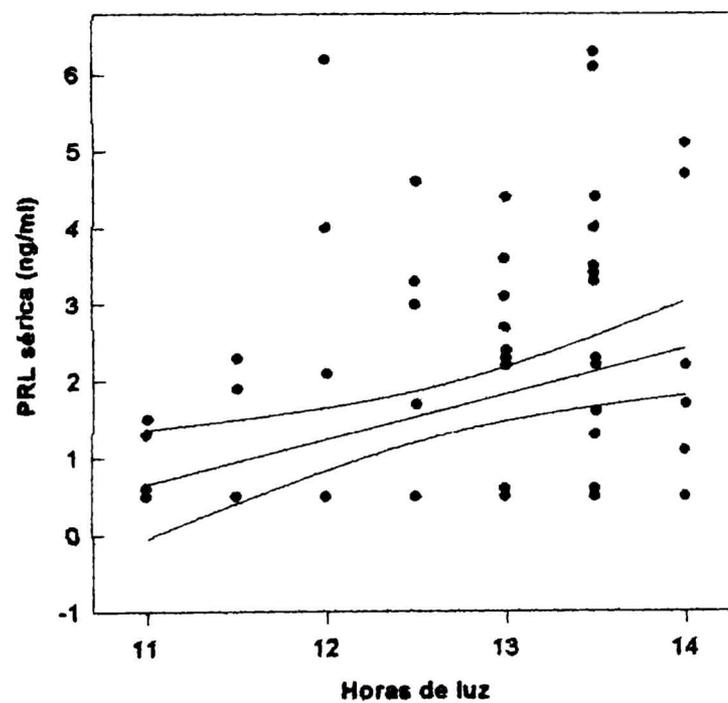
## Bibliografía

1. ASA, C.S. (1996) Hormonal and experimental factors in the expression of social and parenteral behavior in canids. En: FRENCH, J.A.; SOLOMON, A. (eds), *Cooperative Breeding in Mammals*. Cambridge University Press, Cambridge. 129-149.
2. ASCHOFF, J. (1965). Circadian rhythms in man. *Science* 148: 1427-1432.
3. BOUCHARD, G.; YOUNGQUIST, R.S.; KRAUSE, G.F.; VAILLANCOURT, D.; KRAUSE, G.F.; GUAY, P.; PARADIS, M.; (1991) Seasonality and interestrus interval in the bitch. *Theriogenology*. 36 (1): 41-50.
4. CURTLEWIS, D.J. (1992) Seasonal prolactin secretion and its role in seasonal reproduction: a review. *Reprod Fertil Dev*. 4: 1-23.
5. FALVO RE, D.E.; PALATIS, L.R.; MOORE, J. (1980) Annual variations in plasma levels of testosterone and luteinizing hormone in the laboratory mongrel dog. *J Endocrinol*. 86: 425-431.
6. FIENI, F.; VERSTEGEN, J.; HERAUD, V.; ONCLIN, K. (1999) Physiologie de la prolactine, pharmacologie des antiprolactiniques et applications chez la chienne. *Pract Med Chir Anim Comp*. 34: 187-199.
7. FORSBERG, C.L.; WALLEN, A. (1992) Effects of whelping and season of the year on the intertrous intervals in dogs. *J Small Anim Prac*. 33: 67-70.
8. FORSBERG, M. (2002) Reproductive Seasonality: the significance of light. In: R Ungerfeld (ed.) *Reproducción en los animales domésticos* Melibea, Montevideo. 120-138.
9. FULLER, J.L. (1956) Photoperiodic control of oestrus in the Basenji. *J Heredity*. 47: 179-180.
10. HORROBIN, D.F. (1974) Prolactin. Medical and Technical Publishing Co, Lancaster. 23-27.
11. JOCHLE, W. (1997) Prolactin in canine and feline reproduction. *Reprod Dom Anim*. 32: 183-193.
12. JOHNSON, A.L.; MALINOWSKI, K. (1983) Daily rhythm of cortisol, and evidence for a photo inducible phase for prolactin secretion in non pregnant mares housed under non interrupted and skeleton photoperiods. *J Anim Sci*. 63: 169-175.
13. KREEGER, T.J.; SEAL, U.S. (1992) Circannual prolactin rhythm in intact dogs housed out doors. *Chronobiologia*. 19 (1-2): 1-8.
14. KREEGER, T.J.; SEAL, U.S.; COHEN, Y.; PLOTKA, E.D.; ASA, C.S. (1991) Characterization of prolactin secretion in gray wolfs. *Can J Zool*. 69: 1366-1374.

15. ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. (1997) In vivo investigation of luteal function in dogs: effect of cabergoline and prolactin on progesterone secretion in mid pregnancy and diestrus. *Reprod Dom Anim.* 14: 25-38.
16. REINBERG, A (1982). Desarrollo y perspectivas de la cronobiología. *La recherche.* 7-24.
17. SOKOLOWSKI, J.H.; STOVER, D.G.; VAN RAVENSAWAAY, F.; (1977) Seasonal incidence of oestrus and interestrus intervals for bitches of seven breeds. *J Am Vet Med Ass.* 171: 271-273.
18. TAHA, M.B.; NOAKES, D.E.; ALLEN, W.E. (1981) The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen. *J Small Anim Prac,* 22: 177.
19. THORNER, M.O.; VANCE, M.L.; LAWS, R.E.; HORVATH, E.; KOVATH, K. (1998) The anterior pituitary. En: WILSON, J.D; FOSTER, D.W.; KRONENBERG, H. M, LARSEN PR (ed). *Williams Textbook of Endocrinology*, 9th ed. Saunders, Philadelphia. 249-340.
20. TOUITOU, Y.; BOGDAN, A.; REINBERG, A.; HAUS, E. (1996) Les rythmes annuels endocriniens chez l'homme. *Pathol Biol.* 44 (7): 654-65.



**Figura 1:** Media de las concentraciones de PRL de muestras de sangre colectadas una vez por mes de 6 perros machos enteros durante un año. Las barras sobre las columnas representan los valores de SEM. Los meses por debajo de la línea fueron significativamente diferentes ( $p < 0.01$ ).



## CAPÍTULO III



### ESTUDIO DE LOS PATRONES DE SECRECIÓN ULTRADIANOS DE PROLACTINA SÉRICA EN EL CANINO MACHO

#### Introducción

El estudio de un fenómeno biológico exige que se responda no sólo a los interrogantes *dónde* y *cómo*, sino también a la pregunta *cuándo*. Se define como ritmos circadianos a aquellos que ocurren en un período aproximado de 24 horas, mientras que ritmos ultradianos se consideran a los ciclos que ocurren con frecuencia menor que una vez al día (9). Se acepta arbitrariamente que la secreción de todas las hormonas adenohipofisarias, ocurre de manera pulsátil. Este patrón pulsátil se considera un importante componente del mecanismo de secreción neuroendócrino (1, 10). Asimismo, el patrón ultradiano de liberación de las hormonas adenohipofisarias involucra principalmente señales derivadas del hipotálamo que actúan sobre las células pituitarias, siendo moduladas alternativamente por factores pituitarios parácrinos y autócrinos, y sistémicamente por un mecanismo de retroalimentación hormonal. Comparado a lo descrito sobre prolactina (PRL) en humanos y ratas, es muy poco lo que se conoce acerca de las características de secreción de PRL en los caninos. La elevación de los niveles de PRL plasmática ha sido reportada en perras preñadas y clínicamente pseudopreñadas (4, 5, 11, 13). Asimismo, no se encontró ritmo circadiano alguno para la PRL en perras en anestro (3, 5), siendo reportado un perfil pulsátil de secreción de PRL en perras Beagle en anestro y diestro (7). Resta aún por describir el patrón ultradiano de PRL en caninos machos.

Desde un punto de vista práctico, el conocimiento de ritmos secretores de PRL es importante, pues el asesoramiento correcto de la función endócrina debe considerar la variabilidad de las concentraciones hormonales en sangre de muestras apropiadamente obtenidas en diversas horas del día.

El objetivo del estudio del presente capítulo radicó en caracterizar el ritmo ultradiano de PRL sérica en el canino macho, en una ventana de tiempo de 6 horas.

## **Materiales y Métodos**

### *Animales*

Cinco perros machos de raza Beagle de una colonia experimental, de  $8\pm 2$  años y 12 a 14 kg de peso fueron incluidos en este estudio. Los animales vivían desde más de un año antes de realizar el estudio en caniles externos, la alimentación consistió en alimento balanceado comercial y agua *ad libitum*. Todos los animales fueron acostumbrados previamente al procedimiento de la toma de muestras sanguíneas.

### *Muestreo sanguíneo*

El presente estudio fue realizado durante el mes de agosto. Las muestras sanguíneas se colectaron con el mínimo estrés posible por venopunción periférica directa (safena/ cefálica/ yugular). La duración del estudio fue de 6 h y los intervalos entre muestras de 15 minutos ( $n = 24$  muestras/ perro) comenzando con la primer toma de muestras a las 7:00 horas y la última a las 13:00 horas. Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 4,000 rpm durante 15 minutos. El suero fue separado y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis hormonal.

### *Ensayo hormonal*

La PRL sérica fue determinada por un análisis enzimo inmunométrico (Milenia, DPC®, Bad Nauheim, Alemania) el cual fue previamente validado (12). Los coeficientes de variación *intra* e *inter* ensayo fueron de 5.3 y 8.7, respectivamente. La sensibilidad al 95% de pegado fue de 0.4 ng/ml. Todas las muestras de un animal dado fueron determinadas en una misma corrida para evitar la variación *inter* ensayo.

### *Análisis Estadístico*

El perfil de secreción de 6 horas de PRL fue analizado por medio del programa *Pulsar* (8). El programa identifica picos secretores mediante la altura y la duración desde una línea basal aplanada, usando el desvío estándar (SD) como factor de escala. Los parámetros de corte G1-G5 % se fijaron en 3.98, 2.40, 1.68, 1.24, y 0.93 veces el SD del ensayo como criterio para aceptar picos de 1, 2, 3, 4 y 5 puntos de ancho, respectivamente. La hora aplanada fue fijada en 3 h. El peso asignado a los picos fue de 0.1. Los

valores A, B y C del programa, usados para calcular la varianza del ensayo fueron fijados en  $A=-0.07$ ,  $B=3.97$ , y  $C=5.66$ . Los valores extraídos del análisis incluyeron la media de la línea basal aplanada (ng/ml), la frecuencia del pulso (picos en 6 horas), la amplitud media del pulso (ng/ml), la duración (minutos) y el área bajo la curva (AUC) (ng/ml \* 6 hora) sobre el nivel cero. Se realizó estadística descriptiva para el análisis de estos valores. Los resultados de ambos estudios fueron expresados como la media  $\pm$ SEM y el nivel de significancia se fijó en  $p < 0.05$ .

## Resultados

Durante el estudio la PRL se caracterizó por una línea basal fluctuante con ocasionales elevaciones distintivas que indicaban una secreción pulsátil (Figura 1). En el perro número 5 la media de PRL basal, el AUC, la frecuencia y la amplitud de los pulsos resultó significativamente distinta a las del resto de los animales, por lo tanto este perro fue excluido de los análisis (Figura 1). La media de la concentración basal de PRL sérica fue de  $1.4 \pm 0.6$  ng/ml y la del AUC fue de  $9.9 \pm 2.7$  ng/ml \* 6 horas. La frecuencia de pulsos de PRL fue de 1 a 2 picos en 6 horas y la duración de cada pulso se extendió de 15 a 75 minutos (media $\pm$ SEM  $45 \pm 11$ ), en tanto que la amplitud de los mismos fue de 2.4 a 1.7 ng/ml (media $\pm$ SEM  $1.7 \pm 0.4$ ).

## Discusión

Según lo esperado, los resultados demostraron que la PRL sérica es secretada de una manera pulsátil en el canino macho tal como ha sido reportado previamente en las hembras (7). La línea basal media suavizada en este estudio resultó similar a la reportada previamente en un estudio ultradiano corto en perros machos (2). Este parámetro tanto como la amplitud de los pulsos fueron levemente más bajos que en un trabajo de pulsatilidad realizado en 4 perras en anestro durante 12 horas (7). Por otro lado, la frecuencia y la duración de los pulsos resultaron, en proporción en el presente trabajo, similares al de las perras en anestro (7).

Cuando se compararon los presentes resultados con las mismas perras muestreadas durante el diestro (7) las diferencias con los machos fueron mucho más importantes. En humanos, las características de la pulsatilidad de la PRL son similares entre las mujeres post-menopáusicas y los hombres (6). Una situación similar parece ocurrir entre perras en anestro y perros machos.

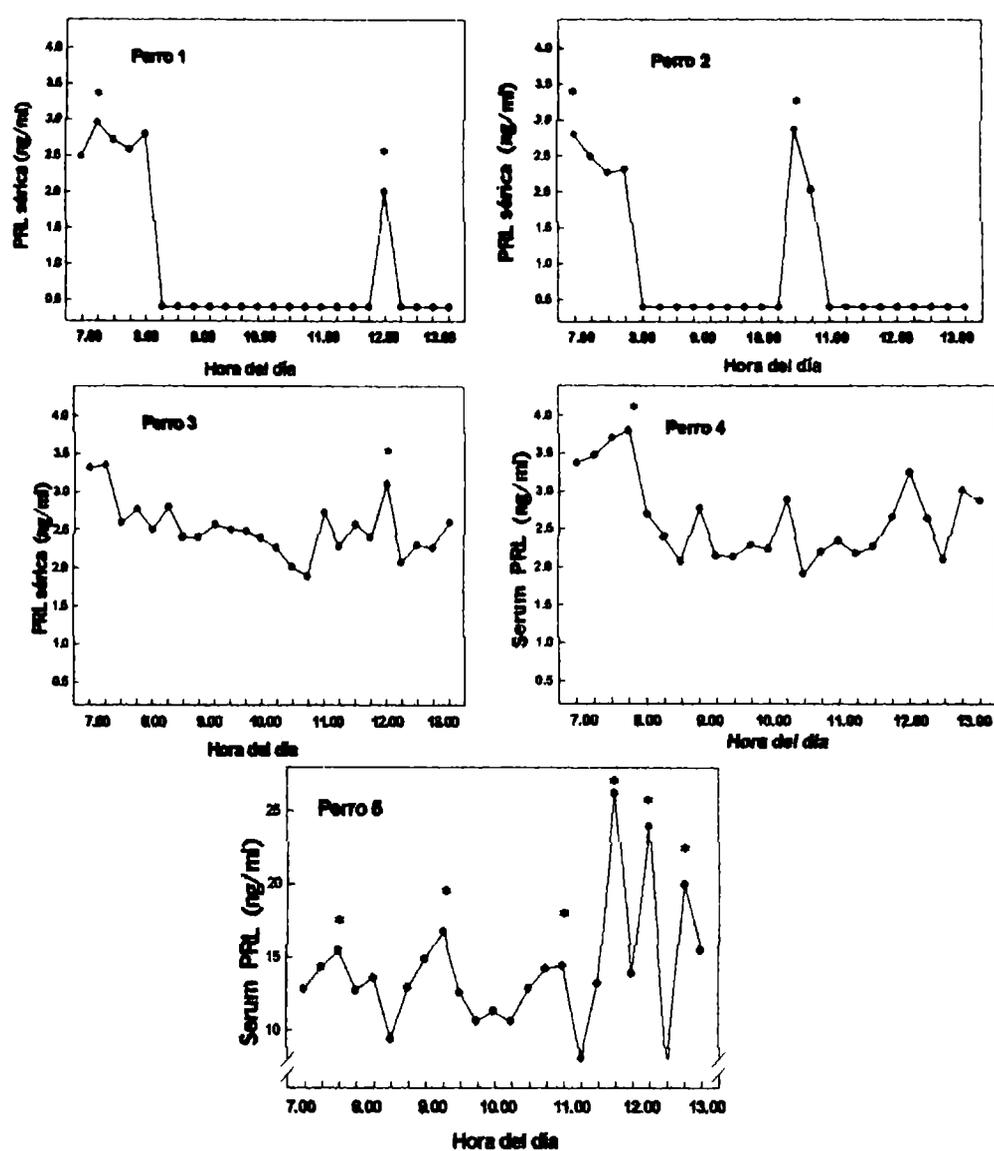
Incluso en el perro número 5, en el cual se halló altas concentraciones de PRL, se encontró pulsatilidad asimismo aumentada en referencia a los otros perros. En el hombre, una de las causas más frecuentes de hiperprolactinemia es el macroprolactinoma, donde la pulsatilidad se altera claramente (14). El perro número 5 se encontraba clínicamente sano y no se le había administrado previamente ninguna medicación. La causa de la hiperprolactinemia en este perro no fue esclarecida ya que no se realizó ningún estudio complementario.

Se concluyó que la secreción de PRL sérica presenta un patrón pulsátil de secreción el cual debe considerarse al momento de realizar la evaluación hormonal en caninos machos.

### **Bibliografía**

1. BRABANT, G.; PRANK, K.; SCHÖFL, C. (1992) Pulsatile patterns in hormone secretion. *Trends Endocrinol Metab.* 3: 183-190.
2. CORRADA, Y.; CASTEX, G.; SOSA, Y.; GOBELLO, C. (2003). Secretory Patterns of Prolactin in Dogs: Circannual and Ultradian Rhythms. *Reprod Dom Anim.* 38 (3): 219-223
3. GOBELLO, C.; DE LA SOTA, L.; GOYA, R. (2001a) Twenty four hour prolactin and LH in crossbred anestrous bitches. *Reprod Dom Anim.* 36: 41-45.
4. GOBELLO, C.; DE LA SOTA, L.; GOYA, R. (2001b). Study of the change of prolactin and progesterone during dopaminergic agonist treatments in pseudopregnant bitches. *Anim Reprod Sci.* 31;66 (3-4):257-67.
5. GRÜNAU, B. (1994) Zur Bedeutung von Prolaktin bei Pseudogravidität des Hundin. Tesis PhD, Hannover, Alemania. 105.
6. KATZNELSON, L.; RISKIN, P.N.; SAXE, V.C.; KLIBANSKI, A. (1998) Prolactin pulsatile characteristics in post menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 83: 761-764.
7. KOOISTRA, H. (2000) Adenohypophyseal function in healthy dogs and dogs with pituitary disease. Tesis PhD. Universidad de Utrecht, Holanda. 247.
8. MERRIAM, G.R.; WACHTER, K.W. (1992) Algorithms for the study of episodic hormone secretion. *Am J Physiol.* 243: E310-E318.
9. MOL, J.A.; RIJNBEEK, A. (1997) Pituitary function. En: Kanero, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. (eds) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed. Academic Press, San Diego. 517-551.

10. NEGRO-VILAR, A.; CULLER, M.D.; VALENCA, M.M.; FLACK, T.B.; WISNIEWSKI, G. (1987) Pulsatile peptide secretion: encoding of brain messages regulating endocrine and reproductive functions. *Environ Health Perspect.* 75: 37-43.
11. OKKENS, A.C.; DIELEMAN S.J.; KOOISTRA H.S.; BEVERS, M.M. (1997). Plasma concentrations of prolactin in overly pseudopregnant Afghan hounds and the effect of metergoline. *J Reprod Fertil (Suppl)*. 51: 295-301.
12. ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. (1997) In vivo investigation of luteal function in dogs: effect of cabergoline and prolactin on progesterone secretion in mid pregnancy and diestrus. *Reprod Dom Anim.* 14: 25-38.
13. STEINETZ, B.G.; GOLDSMITH, L.T.; HASAN, S.H.; LUST, G.(1990). Diurnal variation of serum progesterone but not relaxine, prolactin, or estradiol-17 $\beta$  in the pregnant bitch. *Endocrinology.* 127: 1057-1063.
14. THORNER, M.O.; VANCE, M.L.; HORVATH, E.; KOVATH K. (1992) The Anterior Pituitary. En: *Williams Textbook of Endocrinology.* 8th ed. WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. (eds). WB Saunders, Philadelphia. 221-310.



**Figura 1:** Patrón ultradiano de secreción de PRL sérica individuales en 5 perros Beagles machos durante una ventana de tiempo de 6 horas. Las muestras sanguíneas fueron tomadas con intervalos de 15 minutos. Los asteriscos muestran pulsos significativos calculados con el programa *Pulsar*. La escala para el perro número 5 fue ampliada.

## CAPÍTULO IV



### INDUCCIÓN DE CICLOS ESTRALES EN LA PERRA CON EL AGONISTA DOPAMINÉRGICO CABERGOLINA

#### Introducción

La perra, a diferencia de otras especies domésticas y de laboratorio posee un ciclo estral bifásico que se caracteriza por la lenta progresión de cada una de sus fases (8). Específicamente, un anestro largo y obligado resulta en intervalos entre ciclos estrales de hasta 11 meses (3, 8). Por lo tanto, el acortamiento del intervalo interestro (IIE) e inducción de ciclos estrales fértiles es frecuentemente requerido en perras utilizadas para la cría. Algunas de las indicaciones para acortar el IIE incluyen las fallas en la realización de servicios o bien de concepción en ciclos estrales previos, como así también, evitar la sincronización natural de los ciclos en criaderos, a fin de obtener cachorros para la venta a lo largo de todo el año. Además, en la perra, al igual que en otras especies, es necesario ejercer cierto control sobre el ciclo estral para poder aplicar cualquiera de las técnicas de reproducción asistida.

En los caninos ha sido particularmente difícil el diseño de protocolos confiables de inducción de ciclos estrales fértiles, debido a que los factores neuroendócrinos que regulan la terminación del anestro y el inicio de un nuevo ciclo no se conocen totalmente (4). Los mayores avances en este campo han sido experimentales, encontrándose que los agonistas dopaminérgicos pueden regular la duración del IIE en esta especie (4, 7, 20, 23).

Los agonistas dopaminérgicos tales como la bromocriptina y la cabergolina son derivados del cornezuelo del centeno que actúan directamente sobre los receptores pituitarios dopaminérgicos para modificar la síntesis y la liberación de prolactina (PRL) por las células pituitarias (9, 12, 15). La cabergolina tiene pocos efectos secundarios, y posee una mayor duración de acción y potencia que otros agonistas dopaminérgicos (9). El mecanismo exacto de acción por el cual los agonistas dopaminérgicos pueden iniciar un ciclo estral no está del todo claro; sin embargo, las hipótesis incluyen un efecto estimulante directo sobre el eje gonadal, y menos probablemente, un efecto periférico a nivel ovárico (10, 11, 13).

En un estudio inicial en 23 perras que cursaban con anestro prolongado se les administró un derivado de la ergolina, el FCE 21336. Todas las hembras tuvieron estro dentro de los 12 días de tratamiento, y 12 de las 14 perras apareadas quedaron preñadas (1). En otro estudio, la cabergolina se administró a un grupo de perras en dosis de 5µg/kg, cada 24 horas durante 14 días comenzando 4.5 a 6 meses posteriores al estro anterior, a fin de compararlas con un grupo placebo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los IIE entre los dos grupos (16). En otro estudio más reciente, la misma droga y dosis fue administrada a partir del día 30 después del pico de hormona luteinizante (LH) hasta 2 días después del inicio del proestro en 5 perras Beagle. La reducción en el IIE fue de 216 a 66.5 días en 4 de las 5 perras tratadas, sin embargo ninguna de las perras quedó preñada luego del servicio (14). Contrariamente, en un estudio que incluía un grupo placebo, se trataron 15 perras Beagle con el mencionado protocolo de cabergolina comenzando en anestro temprano (día 93 a 108), medio (día 123 a 156), y tardío (día 161 a 192), resultando un IIE más corto y más sincronizado en 14 de las perras cuando se las comparó con el grupo placebo. Doce de los 15 animales tratados quedaron preñadas luego del apareamiento, y parieron cachorros normales (24).

Actualmente, son escasos los datos disponibles respecto del uso de cabergolina para este propósito, a excepción de los disponibles en un pequeño número de perras Beagle de laboratorio (10, 21). Por lo tanto, el propósito de este capítulo fue proporcionar información con respecto a la eficacia y la seguridad del uso de cabergolina en la inducción del estro y el acortamiento del IIE en perras de diversas razas en condiciones controladas de campo.

## **Materiales y Métodos**

### *Animales*

A veintitrés perras de propietarios privados, de 2 a 5 años de edad, clínicamente sanas, de razas puras (Labrador Retriever [ n=1 ], Dogo de Bordeos [ n=1 ], Beagle [ n=1 ], San Bernardo [ n=1 ], Rottweiler [ n=1 ], Collie [ n=1 ], Cocker Spaniel [ n=2 ], Basset Hound [ n=2 ], Boxer [ n=5 ], y Dogo Argentino [ n=8 ]) se les determinó el estadio del anestro con la finalidad de incluirlas en este estudio. El estado de anestro se estableció de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de la citología vaginal y la vaginoscopia, y fue confirmado por las concentraciones séricas de progesterona ( $P_4$ ; < 1.5 ng/mL; 3, 8).

Las perras permanecieron en sus criaderos durante el período de estudio. Todos los propietarios firmaron un consentimiento para incluir a sus animales en el ensayo.

### *Protocolo*

Se registraron en todas las perras 2 IIEs consecutivos (n=46). El IIE se definió como el período entre el primer día de proestro (signos de edematización vulvar y descarga sanguinolenta vaginal, 8) de un ciclo estral al primer día de proestro del ciclo siguiente (8, 19). Después del día 100 del comienzo del segundo proestro, se administró a todas las perras cabergolina (Galastop; CEVA-VETEM, Francia) en dosis de 5 µg/kg, oral cada 24 horas con el alimento comenzando en anestro temprano (n=11), medio (n=10), y tardío (n=2) hasta 2 días después del inicio del proestro inducido. En todas las perras se consideró arbitrariamente de 90 días la duración de la sumatoria de las fases folicular y lútea (3, 8). El momento del anestro fue calculado para cada perra restando los 90 días al IIE anterior y dividiendo los días restantes en tres, definiendo al primero, segundo y tercer tercios como anestro temprano, medio, y tardío, respectivamente.

Durante el ciclo inducido con cabergolina todas las perras fueron apareadas en forma natural. El momento del servicio se basó exclusivamente en el comportamiento de estro de las hembras. Durante el periodo en estudio se registraron eventuales efectos secundarios a la administración de cabergolina.

### *Citología Vaginal*

Para el seguimiento del desarrollo folicular de los ciclos inducidos se realizó el estudio de la citología vaginal diario desde el inicio del proestro hasta el diestro en la totalidad de las hembras. Los preparados se realizaron según Corrada 2001 (5), y se tiñeron empleando una coloración modificada de May Grünwald Giemsa (Biopur SRL, Argentina).

### *Ensayo Hormonal*

A todos los animales del grupo tratado y control se les tomó una muestra sanguínea por venopunción periférica a las 3 semanas del estro inducido para determinación de P<sub>4</sub> sérica a fin de confirmar la ovulación (P<sub>4</sub>, > 5 ng/mL, 8). La P<sub>4</sub> sérica fue realizada por radioinmunoanálisis usando un ensayo

comercial de fase sólida (Coat-A-Count, DPC; Los Angeles, CA). La sensibilidad al 95% fue de 0.1 ng/mL, y los coeficientes de variación *intra e inter* ensayo fueron de 4.9% y 7.6%, respectivamente.

### *Análisis Estadístico*

Los días de IIE de los períodos previos al tratamiento (n=23) y tratados (n=23) fueron analizados por ANOVA. El modelo matemático incluyó el efecto del tratamiento. Se realizó un análisis de correlación entre el período de anestro (temprano, medio y tardío) en el que se empezó el tratamiento y el número de días requerido para inducir el proestro. Se calculó la proporción de hembras que tuvieron ciclos normales (fase folicular y ovulación, 8), gestación, y efectos adversos gastrointestinales. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM y el nivel de significancia se fijó en  $p < 0.05$ .

### **Resultados**

Los IIEs del período tratado con cabergolina fueron significativamente más cortos que los no tratados ( $184 \pm 4.5$  versus  $239 \pm 4.5$ , respectivamente;  $P < 0.01$ ). El promedio del número de días desde la iniciación del tratamiento con cabergolina hasta el comienzo del proestro fue de  $21.4 \pm 2.9$  días (LSM  $\pm$  SEM) con un rango de 2 a 48 días. El promedio  $\pm$  SEM de la duración del tratamiento con cabergolina en anestro temprano, medio y tardío fue de  $27.4 \pm 3.7$ ,  $17.6 \pm 3.8$ , y  $5 \pm 3$  días, respectivamente. Una perra Cocker Spaniel, que al inicio del tratamiento se encontraba en anestro medio, necesitó 77 días de tratamiento para comenzar el proestro; por lo tanto, esta perra fue considerada como marginal, y no fue incluida dentro de los cálculos (Tabla 1). Se halló una correlación significativa entre el estadio del anestro en el que se iniciaron los tratamientos y la duración de los mismos ( $P < 0.01$ ). Los tratamientos iniciados en anestro temprano requirieron más días para inducir proestro que aquellos iniciados en anestro tardío.

Todos los ciclos estrales inducidos con cabergolina (23/23), basados en la citología vaginal y en la confirmación de la ovulación, fueron normales. La duración y características físicas de estos ciclos fueron similares a los de los ciclos estrales espontáneos pre-tratamiento. Diecinueve de los 23 ciclos estrales inducidos con cabergolina (82.6%) fueron seguidos de preñez y las hembras parieron camadas cualitativamente normales (Tabla 1). Tales ciclos exitosos ocurrieron en 9/11, 9/10, y 1/2 de las perras inducidas en anestro temprano, medio, y tardío, respectivamente. Durante el período de estudio en las

perras tratadas con cabergolina no se observó ninguno de los trastornos gastrointestinales reportados previamente para esta droga (9).

Las 3 perras Dogo Argentino y 4 de manto bayo (2 Bóxer, 1 Bull Terrier y 1 Dogo de Burdeos) presentaron cambios en el color del pelo a partir del día 14 del tratamiento que persistieron hasta después del parto. Las perras bayas se tornaron amarillentas mientras que en las Dogo Argentino aparecieron pequeñas manchas negras.

### **Discusión**

La inducción y el control de los ciclos estrales son a menudo útiles para los criadores como así también para la aplicación de técnicas de reproducción asistida. La mayoría de las investigaciones sobre este tópico han sido realizadas sólo en condiciones experimentales de laboratorio con perras de raza Beagle. Estas perras de experimentación podrían tener características fisiológicas reproductivas únicas para su raza. Por otra parte, los caninos de laboratorio viven generalmente en grandes colonias, un tipo de vida absolutamente diferente al de la mayoría de los animales domésticos con propietarios particulares. Si bien el uso de animales de experimentación permite el control de muchas de las variables, la extrapolación de resultados a animales de otras razas o a condiciones de campo, puede no ser valedera. Por lo tanto, el propósito de este estudio fue probar la eficacia y la seguridad de la cabergolina para el acortamiento del IIE en condiciones de campo controladas utilizando diversas razas caninas. Se han reportado previamente diferencias significativas en la duración del IIE entre las razas (2, 3, 19) como así también dentro de una misma raza (3). Debido a ello y para reducir la gran variabilidad entre los animales en este estudio, cada perra fue utilizada como su propio control.

Los resultados de este ensayo fueron similares a reportes previos realizados en animales de laboratorio, demostrando que el uso de cabergolina es un método eficaz para inducir estro y acortar el IIE en perras de diversas razas (6, 24). No obstante, discrepan con un reporte previo en el cual no se obtuvo reducción del IIE luego de igual tratamiento (16). Sin embargo, en ese reporte la duración del tratamiento con cabergolina fue fijado en 14 días por lo cual pudo haberse imposibilitado una respuesta apropiada, especialmente para aquellas perras en las cuales se inició temprano en el ciclo estral (16).

En otro estudio, la misma dosis de cabergolina fue usada en 3 perras de diversas razas, tomando 12, 27, y 28 días hasta la aparición del ciclo estral (21). Esto se compara favorablemente con la media de tratamiento de 21.4 días requeridos en este ensayo clínico.

La duración del tratamiento con cabergolina en este estudio en las 3 etapas del anestro fue levemente más prolongada que un reporte previo realizado en Beagles. En dicho trabajo, la aparición del proestro comenzando igual tratamiento en anestro temprano, medio, y tardío tomó  $20 \pm 5$ ,  $14 \pm 6$ , y  $6 \pm 2$  días (24). Estas diferencias podrían reflejar variaciones en respuesta al tratamiento dependiente de las razas utilizadas. Sin embargo, en ambos estudios cuanto más tarde en el anestro se comenzó el tratamiento, menos que la cantidad de días que se requirieron para inducir el proestro (24).

Todos los ciclos estrales inducidos con el tratamiento de cabergolina fueron considerados normales, según los resultados de la citología vaginal y la confirmación de la ovulación. Asimismo, los porcentajes de gestación fueron similares a las tasas de preñez obtenidas en reportes previos, los cuales variaron de 85.7 al 93% (16, 24). Debido a que en el presente estudio el manejo del servicio se basó sólo en el comportamiento del estro, la falla de preñez en 4 de las perras no se pudo atribuir completamente a fallas del tratamiento. La falla de preñez encontrada en un estudio previo en el cual el tratamiento se inició 30 días posteriores al pico de LH, probablemente se debió al insuficiente tiempo para que acontezca la involución uterina normal del ciclo anterior (14).

En contraste con los leves efectos secundarios gastrointestinales reportados previamente para la misma dosis de cabergolina, en el actual ensayo no se observó ningún efecto secundario digestivo (16, 24). La administración de cabergolina con el alimento pudo haber atenuado cualquier trastorno intestinal, marcándose esta diferencia.

Se deduce que el cambio de color del manto en algunas perras durante el periodo tratado fue el resultado de la administración de cabergolina. Se especula que podría estar mediado por la inhibición de la secreción de hormona melanocito estimulante por la administración del agonista dopaminérgico (17, 18, 22). Esto podría explicar la aclaración reversible del color del pelo experimentado por las perras bayas, resultando más difícil de explicar los cambios producidos en las Dogo Argentino.

Se concluye que la administración de cabergolina en dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , oral cada 24 horas durante el anestro fue un método eficiente, seguro, y fácil para la inducción de ciclos estrales fértiles normales y para

disminuir el IIE en este grupo de perras de diversas razas. El agonista dopaminérgico cabergolina, puede proporcionar un método de confianza para mejorar la eficiencia reproductiva. Son aún necesarios estudios adicionales para garantizar cualquier posible efecto sobre la salud general debido al uso repetido de cabergolina.

### **Bibliografía**

1. ARBEITER, K.; BARSCH, E. (1988) Possibilities of initiation of estrus in the bitch with an ergoline derivate. *J Vet Med.* 35:111-117.
2. BOUCHARD, G.; YOUNGQUIST, R.S.; KRAUSE, G.F.; VAILLANCOURT, D.; KRAUSE, G.F.; GUAY, P.; PARADIS, M. (1991) Seasonality and interestrous interval in the bitch. *Theriogenology.* 36(1):41-50.
3. CONCANNON, P.W. (1986) Canine physiology of reproduction. En: BURKE, T. (ed). *Small animal reproduction and infertility.* Philadelphia: Lea & Febiger. 3-27.
4. CONCANNON, P.W. (1993) Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J Reprod Fertil.* 47:3-27.
5. CORRADA, Y.; GOBELLO, C. 2001. Citología vaginal en la perra. *Revista Selecciones Veterinarias.* 9 (5): 454-474.
6. CORRADA, Y.; GOBELLO, C.; CASTEX, G.; BALLABIO, R. (2001) Shortening of interestrous intervals with cabergoline in the bitch. En: *Proceedings del Annual Symposium of European Society of Small Animal Reproduction.* Milán. 137-138.
7. CORRADA, Y; GOBELLO, C. (2001) Estrous induction with dopaminergic agonists in the bitch: a review. *Communications in Theriogenology.*
8. FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. (1996) Ovarian cycle and vaginal cytology. En: *Canine and feline endocrinology and reproduction.* 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders. 526-546.
9. FIENI, F. ; VERSTEGEN, J. ; HERAND, V. ; ONCLIN, K. (1999) Physiologie de la prolactine pharmacologie des antiprolactiniques et applications chez la chienne. *Prat Med Chir Anim Comp.* 34:187-199.
10. GOBELLO, C.; DE LA SOTA, L. GOYA, R. (2001). Study of the change of prolactin and progesterone during dopaminergic agonist treatments in pseudopregnant bitches. *Anim Reprod Sci.* 31; 66 (3-4): 257-267

11. HARVEY, M.A.; CAUVIN, A.; DALE, M.; LINDLEY, S.; BALLABIO, R. (1997) Effect and mechanism of the antiprolactin drug cabergoline on pseudopregnancy in the bitch. *J Sm Anim Pract.* 38:336-339.
12. JANSSENS, L.A. (1986) Treatment of pseudopregnancy with bromocriptine, an ergot alkaloid. *Vet Rec.* 119:172-174.
13. JEFFCOATE, I.A. (1993) Endocrinology of anestrus bitches. *J Reprod Fertil.* 47:69-76.
14. JEUKENNE, P.; VERSTEGEN, J. (1997) Termination of diestrus and induction of estrus in diestrus non pregnant bitches by the prolactin antagonist cabergoline. *J Reprod Fertil.* 51:59-66.
15. JÖCHLE, W. (1987) The sexual cycle in the bitch: recent insights and impact on therapy and reproduction. *Tieraarzl-Prax.* 15:295-300.
16. JÖCHLE, W.; ARBEITER, K.; POST, K.; BALLABIO, R.; D'VER, A.S. (1989) Effects on pseudopregnancy, pregnancy and interestrus intervals of pharmacological suppression of prolactin secretion in female dogs and cats. *J Reprod Fertil.* 39:199-207.
17. JOHNSON, P.D.; DAWSON, B.V.; DORR, R.T.; HADLEY, M.E.; LEVINE, N.; HRUBY, V.J. (1994). Coat colour darkening in a dog in response to a potent melanotropic peptide. *Am J Vet Res.* 55 (11):1593-1596.
18. LEVITIN, H.P.; GOMEZ DUMM, C.L.; ITURRIZA, F.C. (1979). Alteration of the Agouti mouse coat colour pattern by bromoergocryptine. Possible involvement of MSH. *Neuroendocrinology.* 29 (6):391-398.
19. LINDE-FORSBERG, C.; WALLEN, A. (1992) Effects of whelping and season of the year on the interestrus intervals in dogs. *J Small Anim Pract.* 33:67-70.
20. OKKENS, A.C.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; WILLEMSE, A.H. (1985) Shortening of the interestrus interval of the cyclic dog by bromocriptine treatment. *Vet Quart.* 7:173-176.
21. ROTA, A.; ROMAGNOLI, S. (2000) One year of breeding management in a dog kennel. En: *Proceedings, 4th International Symposium on dog and cat reproduction.* Norway. 83.
22. THODY, A.J.; RIDLEY, K.; CARTER, R.J.; LUCAS, A.M.; SHUSTER, S. (1984). Alpha-MSH and coat colour changes in the mouse. *Peptides.* 5 (6):1031-1036.
23. VAN HAAFTEN, B.; DIELEMAN, S.J.; OKKENS, A.C.; BEVERS, M.M. WILLEMSE AH. (1989) Induction of estrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and/or bromocriptine. *J Reprod Fertil Suppl.* 39:330-331.
24. VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K.; SILVA, L.; CONCANNON, P. (1999). Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology.* 51:597-611.

Caso No.	Raza	Edad (años)	Pre-tratamiento IIE <sup>†</sup>	Post-tratamiento IIE <sup>†</sup>	Momento del anestro de inicio del tratamiento	Duración del tratamiento <sup>*</sup> (días)	Ciclo estral normal post cabergolina	Preñez
1	Dogo Argentino	2	189	130	Temprano	25	Sí	Sí
2	Dogo Argentino	3	196	144	Temprano	27	Sí	Sí
3	Dogo Argentino	4	180	131	Temprano	11	Sí	Sí
4	Dogo Argentino	4	188	130	Temprano	13	Sí	Sí
5	Dogo Argentino	3	207	140	Temprano	15	Sí	Sí
6	Dogo Argentino	4	188	140	Temprano	17	Sí	Sí
7	Dogo Argentino	2	165	144	Temprano	44	Sí	Sí
8	Rottweiler	3	330	210	Temprano	43	Sí	Sí
9	Dogo de Burdeos	3	270	177	Temprano	48	Sí	Sí
10	Beagle	4	200	146	Temprano	35	Sí	No
11	San Bernardo	3	180	142	Temprano	24	Sí	No
12	Cocker spaniel	5	298	260	Medio	77	Sí	Sí
13	Boxer	3	330	250	Medio	13	Sí	No
14	Boxer	3	263	190	Medio	33	Sí	Sí
15	Boxer	4	212	191	Medio	26	Sí	Sí
16	Boxer	4	300	196	Medio	31	Sí	Sí
17	Boxer	5	400	300	Medio	28	Sí	Sí
18	Basset hound	4	180	145	Medio	4	Sí	Sí
19	Basset hound	3	184	155	Medio	6	Sí	Sí
20	Collie	3	300	240	Medio	7	Sí	Sí
21	Dogo Argentino	4	150	127	Medio	11	Sí	Sí
22	Cocker spaniel	3	300	272	Tardío	2	Sí	No
23	Labrador retriever	3	305	297	Tardío	8	Sí	Sí

\* Cabergolina (Galastop; CEVA-VETEM, Francia): dosis de 5 µg/kg, oral cada 24 horas

† IIE= intervalo interestro

**Tabla 1:** Descripción y resultados de la inducción de estro con cabergolina\* en 23 perras de diferentes razas durante diferentes períodos del anestro.

## CAPÍTULO V



### ESTUDIO ENDOCRINOLÓGICO Y CLÍNICO COMPARATIVO DE PROTOCOLOS COMBINADOS CON AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS Y PROSTAGLANDINAS EN LA INTERRUPCIÓN DE LA GESTACIÓN NO DESEADA DE LA PERRA

#### Introducción

En la perra la interrupción de la gestación no deseada es un problema frecuente en la clínica veterinaria diaria. Se han reportado diversos protocolos de estrógenos para terminar la gestación, sin embargo no han sido ampliamente aceptados debido a sus graves efectos secundarios. En referencia a esto, los estrógenos pueden causar hiperplasia endometrial quística e hipoplasia de médula ósea (1, 8).

Las prostaglandinas (PG)  $F2\alpha$  tienen efecto luteolítico y abortivo en la perra (2) inhibiendo la síntesis de progesterona ( $P_4$ ) por activación de la proteínkinasa-C y apertura de los canales de  $Ca^{++}$  ocasionando apoptosis celular (11, 16, 19). Si bien la perra, en comparación con otras especies domésticas es más resistente a los efectos luteolíticos de las PG, es particularmente susceptible a sus efectos secundarios. Por lo tanto, los protocolos de PG requieren generalmente un considerable número de aplicaciones que ocasionan frecuentemente salivación, vómitos, diarrea, hiperpnea y ataxia (9, 17). El dinoprost (Enzaprost-F®, Syntial, Argentina) se encuentran disponibles para el uso en pequeños animales en la mayoría de los países. En tanto, los análogos sintéticos de PG incluyendo el cloprostenol (Estrumate®, Schering Plough, Argentina), se encuentra disponible comercialmente sólo para el uso en grandes animales. Los análogos sintéticos, en comparación con las formas naturales tienen la ventaja de poseer un mayor efecto luteolítico con menor incidencia en el músculo liso, por lo cual pueden ser utilizados en dosis mucho más bajas con menores efectos colaterales (6, 9)

Han sido reportadas recientemente diferentes combinaciones de  $PGF2\alpha$  y agonistas dopaminérgicos para interrumpir eficientemente la gestación a partir del día 25 del pico de hormona luteinizante sin los efectos secundarios del tratamiento con estrógenos (14, 15, 20). Ha sido sugerido un efecto sinérgico para estos 2 grupos de drogas en la disminución de los niveles de  $P_4$  (15). Las PG tienen una acción directa, mientras que los agonistas dopaminérgicos actúan indirectamente en el cuerpo lúteo por inhibición de su hormona luteotrófica principal: la prolactina (3, 12, 13). Sin embargo la mayoría de los estudios reportados han sido realizados en un número limitado de perros Beagle de experimentación (14, 15)

Entre los agonistas dopaminérgicos se pueden mencionar a la bromocriptina y la cabergolina. Sin bien la cabergolina es más potente y segura que la bromocriptina, su indicación rutinaria está a menudo restringida por su costo elevado (5). Por lo tanto, el interés de este capítulo radicó en probar y comparar la eficacia y seguridad de 2 protocolos combinados de bromocriptina y 2 diferentes PG en casos clínicos.

## **Materiales y métodos**

### *Animales*

Veinticinco perras sanas con preñez no deseada, mestizas y de raza, de 1 a 11 años de edad, y un peso de 5 a 28 kg fueron incluidas en los protocolos de interrupción de gestación. Siete perras preñadas con las mismas características de las anteriores fueron utilizadas como grupo control durante el período de estudio.

### *Procedimiento*

La confirmación o la ausencia de preñez fue diagnosticada ecográficamente a partir del día 25 del primer servicio en todas las perras (Hitachi EUB 415, modo B/M, transductor de 7.5 MHz, 18). El momento del servicio fue utilizado como aproximación de la edad gestacional. Las perras preñadas se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos:

- Tratamiento 1 (TRT1; n = 12): se les administró una combinación de dosis ascendentes del bromocriptina y dinoprost (Tabla 1)
- Tratamiento 2 (TRT2; n = 13): recibieron una combinación de igual dosis de bromocriptina y de cloprostenol luego de diluirlo en solución salina fisiológica (Tabla 1).

Para el experimento se fabricaron comprimidos de bromocriptina de 100 µg cada uno. Ambos tratamientos se continuaron hasta la terminación de la preñez (aborto o resorción) confirmada por ultrasonografía. Luego de la interrupción, se prosiguió con igual dosis de PG durante 2 días más. Las hembras control (n=7) no recibieron ningún tratamiento.

### *Monitoreo ultrasonográfico*

Las perras fueron monitoreadas ecográficamente (Toshiba Core Visión Pro, Shimoishigami, Otawara-Shi, Tochigi-Ken, Japan, transductor de 3.7 o 5 MHz microcónvex) día por medio hasta la interrupción de la preñez y luego a las 48 horas. Las perras control fueron monitoreadas con la misma frecuencia hasta el parto y luego a los 2 días.

Se realizó la medición y registro de los diámetros de los sacos gestacionales, latidos cardíacos y anatomía de los fetos y restos placentarios (10). La resorción fue definida como la muerte de todos los embriones o fetos, con disminución del volumen de la ampolla fetal, fallo cardíaco y homogeneización de las estructuras embrionarias o fetales. Se consideró aborto cuando se visualizó la expulsión de los fetos y/o posterior vacuidad uterina (10, 15).

#### *Análisis estadístico*

Se calculó la proporción de perras preñadas luego del servicio y el éxito de los tratamientos (terminación de la preñez). Los días de tratamiento requeridos hasta la interrupción fueron analizados por ANOVA. El modelo matemático incluyó el efecto principal del tratamiento. La frecuencia de las perras que tuvieron efectos secundarios, y cambios de la glándula mamaria (agrandamiento/secreción láctea) fueron analizados por análisis de datos categóricos. Para caracterizar mejor el ensayo, la edad gestacional fue también correlacionada con los días de tratamiento requeridos para la inducción de resorción o aborto. Los resultados se expresaron en media  $\pm$  SEM. El nivel de significancia estadística se fijó en  $p < 0.05$ .

#### **Resultados**

Veinticinco de las 34 perras examinadas se diagnosticaron con preñez positiva (73.6%) del día 25 a 42, mientras que en las otras 9 (26.4%) el diagnóstico fue negativo. El éxito del tratamiento fue del 100% en ambos grupos tratados. Las perras control tuvieron resultados ultrasonográficos normales a través de la gestación y parieron camadas normales (Tabla 2). Los días requeridos de tratamiento para interrumpir la preñez no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos TRT1 y TRT2 ( $5.0 \pm 0.6$  vs.  $3.7 \pm 0.6$ , respectivamente).

Asimismo se extendieron en un rango de 3 a 10 días para el TRT1 y de 1.5 a 10 días para el TRT2. El aborto fue precedido por una secuencia de eventos similares a los que suceden durante el parto normal. Una perra del grupo TRT2 presentó un aborto fraccionado, es decir, abortó parcialmente el día 3 y totalmente el día 10 del protocolo (perra número 16). Cuando se analizaron ambos tratamientos juntos, el análisis de correlación entre la edad gestacional y los días de tratamiento fue de  $-0.35$  ( $p = 0.08$ ).

Los efectos secundarios estuvieron solamente presentes en las perras del tratamiento TRT1, mientras que en el grupo TRT2 no se registraron ( $p < 0.01$ ). Los efectos secundarios del TRT1 aparecieron 30 minutos después de la inyección del dinoprost y se extendieron no más de 45-50 minutos. Estos consistieron en vómitos, náuseas, arcadas e hiperventilación, fueron leves y no ocasionaron la interrupción del tratamiento en ninguno de los casos. Al finalizar los protocolos la secreción de leche por la glándula mamaria estuvo presente en 3/12 y 6/13 de las perras del TRT1 y del TRT2, respectivamente.

Algunas perras tuvieron pseudopreñez de duración e intensidad similar a la cursada en ciclos estrales anteriores. En 3/12 y 2/13 de los mismos grupos presentaron sólo agrandamiento mamario. La interrupción de la gestación fue seguida por descarga vulvar muco-sanguinolenta durante 3 a 10 días, con involución uterina normal en todos los casos a las 48 horas.

## **Discusión**

La terminación de la gestación no deseada en la perra es un problema en la mayoría de los países porque no se dispone de métodos suficientemente efectivos y seguros para realizarla. En un estudio se encontró una ausencia de gestación en el 60% de las perras que habían sido servidas accidentalmente (4). Más del 25% de las perras examinadas inicialmente para ser incluidas en el presente estudio no resultaron preñadas. Esta diferencia con el reporte anterior se podría explicar por el diferente número de servicios recibido por cada perra. Sin embargo, ambos estudios demuestran claramente que el tratamiento para la interrupción de la gestación se debe planificar y llevar a cabo sólo después de realizar el diagnóstico positivo de preñez.

Los protocolos combinados de agonistas dopaminérgicos - PG permiten reducir la dosis de PG y por lo tanto también sus efectos secundarios. Aunque fue utilizada comparativamente una dosis más baja de bromocriptina, los resultados del presente estudio (eficacia 100%) están en línea con un ensayo anterior en 5 perras Beagles de laboratorio en las cuales se utilizó un protocolo similar (15). Incluso con una dosis más baja de cloprostenol, en el presente trabajo se obtuvieron los mismos resultados que en otro reporte (20). La combinación de dinoprost y de bromocriptina administrados durante 5 días tuvo una falla del 100% en 6 perras en ese último reporte (20). Esa diferencia con los presentes resultados utilizando la misma dosis de PG enfatiza la importancia de la extensión de los tratamientos hasta alcanzar el efecto deseado (interrupción de la gestación) en lugar de utilizar un protocolo de tiempo fijo.

Aunque no hubo diferencias significativas entre ambos protocolos, el protocolo TRT2 resultó ser más corto. Además, la dificultad para encontrar una correlación negativa significativa entre la edad gestacional y los días de tratamiento radicó probablemente en el número de perras incluidas en el ensayo, pues se observó una clara tendencia en ese sentido. A nivel experimental, se ha reportado que cuanto más avanzada se encuentra la gestación menor cantidad de días se requieren para su interrupción. Asimismo, la preñez avanzada se asocia con aborto más que con resorción (14). En concordancia, en el presente estudio se halló una tendencia al aborto en las gestaciones avanzadas. Si bien para los dueños la resorción resulta generalmente mucho más aceptable que el aborto, este último fue raramente observado por los propietarios debido la ingestión inmediata del material abortado por parte de las hembras. Se especula que en la perra 16 la causa del aborto fraccionado podría haber sido provocado por una disminución inicial transitoria de la P<sub>4</sub>.

La presencia de vómitos se asocia generalmente a los tratamientos con la administración de bromocriptina, pero en este estudio los efectos secundarios se relacionaron con el dinoprost (12). La administración de la dosis exacta, obtenida mediante el uso de comprimidos especialmente manufacturados para el experimento, el esquema de dosis ascendentes y la administración con el alimento pudieron haber prevenido los efectos secundarios digestivos. Estos efectos del dinoprost fueron transitorios y específicamente los vómitos no fueron productivos al administrar la PG lejos de las comidas. En línea con un reporte previo, ninguno de los efectos secundarios se asoció con la baja dosis administrada cada 48 horas del cloprostenol (15).

La aparición de pseudopreñez después de los tratamientos en algunas perras predispuestas se podría explicar por un aumento abrupto en las concentraciones séricas de prolactina ocasionadas por la disminución de la P<sub>4</sub> inducida por el tratamiento (7).

Los presentes resultados demuestran que estos protocolos combinados son eficientes, no comprometen la salud general de las perras, y pueden ser realizados cuando se cuenta con el diagnóstico positivo de gestación. Por otra parte, el protocolo de cloprostenol se podría utilizar fácilmente sin necesidad de internación de los pacientes. La bromocriptina es administrada vía oral por los dueños y las aplicaciones de PG se realizan cada 2 días luego de los controles ultrasonográficos. Excepto en la perra con el aborto fraccionado, ninguna hembra requirió más de 3 visitas a la clínica. Se concluye que este protocolo de cloprostenol representa una alternativa segura y eficaz para interrumpir gestaciones no deseadas en la perra.

## **Bibliografía**

1. BOWEN, R.A.; OLSON, P.N.; BEHRENDT, M.D.; WHEELER, S.L.; HUSTED, P.W.; NETT, T.M. (1985). Efficacy and toxicity of estrogens commonly used to terminate canine pregnancy. *J Am Vet Med Assoc.* 186:783-788.
2. CONCANNON, P.W.; HANSEL, W. (1977). Prostaglandins F<sub>2α</sub> induce luteolysis, hypothermia and abortion in beagle bitches. *Prostaglandins.* 13:533-542.
3. CONCANNON, P.W.; WESTEIN, R.; WHALEY, S.; FRANK, D. (1987). Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and bromocriptine. *J Reprod Fertil.* 81:175-180.
4. FELDMAN, E.C.; DAVIDSON, A.P.; NELSON, R.W.; MUNRO, C. (1993). Prostaglandin induction of abortion in pregnant bitches after misalliance. *J Am Vet Med Assoc.* 202:1855-1858.
5. FIENI, F. ; VERSTEGEN, J.; HERAND, V.; ONCLIN, K. (1999). Physiologie de la prolactine pharmacologie des antiprolactiniques et applications chez la chienne. *Prat Med Chir Anim Comp.* 34:187-199.

6. FIENI, F.; DUMON, C.; TAINQUIER, D.; BRUYAS, J.F. (1988). Clinical protocol for pregnancy termination in bitches using prostaglandin F<sub>2α</sub>. *J Repr Fertil* 51:245-250.
7. GOBELLO, C.; DE LA SOTA, L.; CASTEX, G.; BASCHAR, H.; GOYA, R. (2001). Diestrus ovariectomy: a model to study the role of progesterone in the onset of canine pseudopregnancy. *J Reprod Fertil*. 57:55-60.
8. LEGENDRE, A.M. (1976). Estrogen induced bone marrow hypoplasia in a dog. *J Am Anim Hosp Ass.* 12:525-527.
9. LEIN, D.H.; CONCANNON, P.W.; HORNBuckle, W.E.; GILBERT, R.O.; GLENDENING, J.R.; DUNLAP, H.L. (1989). Termination of pregnancy in bitches by administration of prostaglandin F<sub>2α</sub>. *J Reprod Fertil*. 39:231-240.
10. MATTOON, J.S.; NYLAND, T.G. (1995). Ultrasonography of the genital system. En: NYLAND, J.S.; MATTOON, T.G. (eds). *Veterinary diagnostic ultrasound*. W.B. Saunders Co, 141-164.
11. NISWENDER, G.; NETT, T. (1988). The corpus luteum and its control. En: EKNOBIL, J.; NEILL, L.; EWING, G. (eds). *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York 489-525.
12. OKKENS, A.C.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.; WILLEMSE, A.H. (1990). Evidence of prolactin as the main luteotropic factor in the cyclic dog. *Vet Quart*. 12 (4):193-201.
13. OKKENS, A.C.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; WILLEMSE, A.H. (1985). Shortening of the interestrus interval of the cyclic dog by bromocriptine treatment. *Vet Quart*. 7:173-176.
14. ONCLIN, K.; SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J.P. (1995). Termination of unwanted pregnancy in dogs with the dopamine agonist cabergoline, in combination with a synthetic analog of PR F<sub>2α</sub>, either cloprostenol or alpha prostol. *Theriogenology* 43:813-822.
15. ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J.P. (1999). Comparison of different combinations of analogues of PGF<sub>2α</sub> and dopamine agonists for the termination of pregnancy in dogs. *Vet Rec* 10; 144 (15):416-419.
16. SHILLE, V.M. Mismating and termination of pregnancy. (1982). *Vet. Clin. North. Am. Small Anim Pract.* 12:99-106.
17. SOKOLOWSKI, J.H.; GENG, S. (1977). Effect of prostaglandin F<sub>2α</sub>-THAM in the bitch. *J Am Anim Hosp Assn.* 170:536-537.
18. TAINQUIER, D.; CLOCART, F.; FIENI, F.; BRUYAS, J.F.; BATTUT, I. (1997). Le suivi de la gestation chez la chienne. *Rec Med Vet* 174 (314): 77-85.
19. VAN DER HORST, C.J.; VOGEL, F. (1977). Some effects of prostaglandin F<sub>2α</sub> on corpora lutea and on the uterus in the cycling dog. *Tijdschr Dierge-neesk.* 102:117-123.
20. VITASEK, R.; DOLEZEL, R. (1998). Interruption of pregnancy in bitch using prostaglandins and bromocriptine. En: *Proceedings 2nd International Conference EVSSAR, Hungria.*

TRT1			TRT2		
Día	Bromocriptina	Dinoprost	Día	Bromocriptina	Cloprostenol
1 <sup>er</sup> día	15 µg/kg oral con las comidas	0.1 mg/kg cada 24 horas SC lejos de las comidas	1 <sup>er</sup> día	15 µg/kg oral con las comidas	1 µg/kg SC lejos de las comidas
2 <sup>do</sup> día	20 µg/kg oral con las comidas	0.15 mg/kg cada 24 horas SC lejos de las comidas	2 <sup>do</sup> día	20 µg/kg oral con las comidas	-----
3 <sup>er</sup> día	20 µg/kg oral con las comidas	0.2 mg/kg kg cada 24 horas SC lejos de las comidas	3 <sup>er</sup> día	20 µg/kg oral con las comidas	1 µg/kg SC lejos de las comidas
Restantes días	30 µg/kg oral con las comidas	0.2 mg/kg kg cada 24 horas SC lejos de las comidas	Restantes días	30 µg/kg oral con las comidas	1 µg/kg SC día por medio lejos de las comidas

**Tabla 1:** Protocolos terapéuticos de los grupos de tratamientos 1 (TRT1) y 2 (TRT2) utilizados en 25 perras para interrupción de la gestación

Porra	Tratamiento	Días del primer servicio	Días de tratamiento	Aborto/ Resorción	Glándula mamaria	Efectos secundarios
1	TRT1	30	4	Aborto	Normal	Si
2	TRT1	40	3.5	Aborto	Normal	Si
3	TRT1	30	3.5	Aborto	Normal	Si
4	TRT1	30	7	Resorción	Normal	Si
5	TRT1	28	9	Resorción	Agrandamiento	Si
6	TRT1	40	3	Aborto	Secreción láctea	Si
7	TRT1	39	3	Aborto	Agrandamiento	Si
8	TRT1	30	6	Aborto	Secreción láctea	Si
9	TRT1	30	10	Resorción	Normal	Si
10	TRT1	29	5	Resorción	Normal	Si
11	TRT1	42	5	Aborto	Secreción láctea	Si
12	TRT1	42	3	Aborto	Agrandamiento	Si
13	TRT2	38	4	Aborto	Secreción láctea	No
14	TRT2	30	4	Resorción	Normal	No
15	TRT2	40	3	Aborto	Secreción láctea	No
16	TRT2	40	3	Aborto		No
16		40	10	Aborto	Secreción láctea	No
17	TRT2	29	4	Aborto	Secreción láctea	No
18	TRT2	36	1.5	Aborto	Agrandamiento	No
19	TRT2	29	3	Resorción	Agrandamiento	No
20	TRT2	45	2	Aborto	Normal	No
21	TRT2	30	2	Aborto	Normal	No
22	TRT2	40	2	Aborto	Normal	No
23	TRT2	42	2	Aborto	Secreción láctea	No
24	TRT2	39	3	Aborto	Secreción láctea	No
25	TRT2	36	6	aborto	Normal	No
26	CO	25	0	Gestación	Gestación	No
27	CO	30	0	Gestación	Gestación	No
28	CO	35	0	Gestación	Gestación	No
29	CO	40	0	Gestación	Gestación	No
30	CO	28	0	Gestación	Gestación	No
31	CO	32	0	Gestación	Gestación	No
32	CO	38	0	Gestación	Gestación	No

**Tabla 2:** Resultados individuales de los animales de la Tabla 1

## CAPÍTULO VI



### **ESTUDIO ENDOCRINOLÓGICO Y CLINICO DEL ANTIPROGESTÁGENO AGLEPRISTONE PARA LA TERMINACIÓN DE LA GESTACIÓN NO DESEADA EN LA PERRA**

#### **Introducción**

En la perra, la progesterona ( $P_4$ ) desempeña un importante papel en el establecimiento y mantenimiento de la gestación (4). Los antiprogestágenos son esteroides sintéticos que se unen con gran afinidad a los receptores de la  $P_4$  sin desencadenar ninguno de los efectos de la hormona nativa. En las perras, se han estudiado 2 antiprogestágenos: el mifepristone (RU 486) y el aglepristone (RU 534) (8). En mujeres embarazadas, el mifepristone es capaz de interrumpir la gestación temprana en el 80% de los casos sin ningún efecto secundario importante (3).

En tanto, el aglepristone es un antiprogestágeno desarrollado recientemente para uso en el mercado veterinario específicamente. Esta droga se halla disponible en varios países europeos y algunos latinoamericanos. En la perra, el aglepristone compite con la  $P_4$  por los receptores uterinos con un índice de fijación 3 mayor que el de la propia hormona endógena (11). En un estudio se utilizó aglepristone en dosis de 10 mg/kg SC 2 veces separadas por 24 horas para interrumpir gestación en perras desde el día 15 a 55 del servicio. El tratamiento temprano (< día 25) dio lugar a la resorción en todos los animales tratados, mientras que la administración tardía (> día 26) indujo aborto dentro de los 7 días de tratamiento en el 96 % de los casos (5). El aborto fue asociado a signos clínicos característicos de parto y descargas vaginales durante 3 a 5 días después de la interrupción. El monitoreo clínico de estos animales durante más de 18 meses no reveló ninguna secuela del tratamiento (5).

En otro estudio, se describió el perfil hormonal durante igual tratamiento con aglepristone en 7 perras con preñez temprana no confirmada (<15 días luego de la ovulación) y 7 perras con preñez media ( $32.0 \pm 1.5$  días luego de la ovulación) comparándolas con 2 perras control. En ese reporte no se modificaron las concentraciones plasmáticas de  $P_4$ , prostaglandina, oxitocina, ni cortisol dentro de las primeras 24 horas

de la administración del antiprogéstágeno (4). No existe en la actualidad, ningún parámetro clínico de fácil obtención para el seguimiento de estos protocolos de interrupción de gestación.

Adicionalmente en nuestro país, como en muchos otros, existe una insuficiente experiencia con esta droga debido fundamentalmente a la falta de disponibilidad de la misma en el mercado veterinario.

El objetivo del presente capítulo consistió en probar la eficiencia y la inocuidad del antiprogéstágeno aglepristone en la terminación de la gestación no deseada en perras bajo condiciones controladas de campo. Secundariamente, describir el perfil sérico de  $P_4$  y de la temperatura rectal antes, durante y después del tratamiento con el antiprogéstágeno.

## **Materiales y métodos**

### *Animales*

Catorce perras sanas con preñez no deseada de menos de 45 días, mestizas y de raza, de 1 a 6 años, y de 5 a 30 kg se incluyeron en este ensayo. La preñez fue confirmada ecográficamente (Toshiba Core Visión Pro, Shimoishigami, Otawara-Shi, Tochigi-Ken, Japan, transductor de 3.7 o 5 MHz microcóncavo, 12) a partir del día 25 del primer servicio en todas las perras incluidas. El momento del servicio fue utilizado como aproximación de la edad gestacional. Todos los propietarios firmaron un consentimiento para incluir a sus animales en el estudio.

### *Protocolo farmacológico y seguimiento clínico*

Las perras se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos:

- Tratamiento (TRT; n=9): 2 dosis de 10 mg/kg SC cada 24 h de aglepristone (Alizine, VIRBAC, Francia)
- Control (CON; n=5): no recibieron ningún tipo de tratamiento.

En la totalidad de los animales se evaluó la temperatura rectal. En el grupo TRT se realizó cada 8 horas comenzando antes de la primera aplicación del aglepristone hasta 32 horas posteriores a la observación clínica de la interrupción de la gestación (aparición de descargas vulvares y/o aborto de fetos). En el grupo control se realizó con igual frecuencia durante 10 días desde el momento del diagnóstico de gestación.

En todas las perras se controló diariamente la aparición y la duración de descargas vulvares, como así también potenciales cambios de conducta o efectos secundarios desde el diagnóstico de gestación hasta 2 semanas luego de la interrupción o del parto en los grupos TRT y CON, respectivamente.

#### *Monitoreo ultrasonográfico*

A las 72 horas de la interrupción clínica de la gestación todas las perras del grupo TRT fueron monitoreadas ultrasonográficamente (Toshiba Core Visión Pro, Shimoishigami, Otawara-Shi, Tochigi-Ken, Japan, transductor de 3.7 o 5 MHz microcóncavo). La interrupción clínica se definió con la aparición de uno o de varios de los siguientes signos: descargas vulvares, comportamiento similar al parto, aborto o descenso  $> 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  de la temperatura rectal.

La resorción ecográfica se consideró como la muerte de todos los embriones o fetos, con disminución del volumen de la ampolla fetal, fallo cardíaco y homogeneización de las estructuras embrionarias o fetales. Del mismo modo, se definió aborto cuando se visualizó vacuidad uterina (9, 10).

#### *Muestreo sanguíneo y dosaje hormonal*

Inmediatamente antes de empezar cada tratamiento (día 1), en el momento de la interrupción clínica de la gestación y a las 72 horas de la misma se tomaron muestras sanguíneas en la totalidad de los animales para determinación de la concentración sérica de  $\text{P}_4$ . Las concentraciones de  $\text{P}_4$  fueron determinadas por un radioinmunoensayo de fase sólida (Coat-A-Count, DPC; Los Angeles, CA). La sensibilidad al 95% fue de 0.1 ng/ml y los coeficientes de variación *intra e inter* ensayo fueron de 5.1 y 8.8, respectivamente.

#### *Análisis estadístico*

Los datos fueron analizados por ANOVA para la concentración de  $\text{P}_4$  sérica y temperatura rectal en las perras tratadas. Se realizó un análisis de datos categóricos para la frecuencia de perras que alcanzaron el éxito del tratamiento (interrupción de la preñez) y efectos colaterales relacionados al tratamiento. El modelo matemático incluyó el efecto del tratamiento (TRT vs CON). Para mayor descripción de los datos, la edad gestacional y los días requeridos de tratamiento fueron examinados por análisis de correlación. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  SEM y el nivel de significancia fue fijado en  $p < 0.05$ .

## Resultados

El éxito del tratamiento fue del 100%, interrumpiéndose la preñez por resorción (n= 6) o aborto (n= 3) en todas las hembras tratadas (Tabla 1), mientras que las perras del grupo control llevaron adelante la gestación y parieron camadas normales ( $p < 0.01$ ). Los días necesarios para interrumpir la gestación variaron de 2 a 7, representando para las perras que abortaron una media  $2.3 \pm 0.3$  días y para las que tuvieron resorción de  $4.3 \pm 0.7$  días.

No se observaron efectos colaterales locales ni sistémicos en ninguno de los pacientes, salvo una descarga vulvar serosanguinolenta durante 3 a 7 días pos interrupción, en todos los casos. Los abortos fueron precedidos por signos similares a los del parto. Tres de las perras presentaron agrandamiento mamario con secreción láctea luego del tratamiento (Tabla 1).

Se determinó una correlación negativa entre los días requeridos para la terminación de la preñez y la edad gestacional en la que se iniciaron los tratamientos ( $-0.6, p < 0.05$ ). La temperatura corporal descendió a menos de  $37.5^{\circ}\text{C}$  en el grupo TRT 16 horas antes de la observación clínica de la interrupción de la gestación para luego retornar paulatinamente a valores normales dentro de las 24 horas posteriores a la misma (Figura 1). En las hembras CON, la temperatura rectal permaneció estable a lo largo de todo el periodo monitoreado. Las concentraciones séricas de  $P_4$  no presentaron variaciones significativas a lo largo del muestreo realizado en el grupo TRT, observándose, igualmente, una leve tendencia al descenso (Figura 2).

## Discusión

La eficacia obtenida en este ensayo está en línea con un estudio previo en el cual se utilizó igual dosis y esquema de administración de aglepristone para interrumpir gestación en perras (5). En dicho estudio, se observó irritación en el punto de inyección del aglepristone. En discordancia, en el presente estudio no se observó ese efecto local, siendo difícil de explicar estas diferencias. En concordancia con los presentes resultados, en un reporte más reciente (4) las concentraciones de  $P_4$  séricas 24 horas luego de la administración de igual protocolo de aglepristone no se modificaron (4). La interrupción de la gestación en ambos trabajos ocurrió en presencia de elevados niveles séricos de  $P_4$  reafirmando el efecto periférico uterino del antiprogestágeno.

Tal como se esperaba de acuerdo a trabajos previos con otras drogas (7), en el presente ensayo se halló una tendencia al aborto cuando el tratamiento se inicia en preñez media o tardía y resorción cuando se inicia en gestación temprana. Del mismo modo, cuanto más avanzada la gestación, menos días se requirieron para su interrupción. El agrandamiento mamario y presencia de secreción láctea observado en 3 perras después del tratamiento podría ser debido al aumento abrupto en las concentraciones séricas de prolactina ocasionado por el bloqueo repentino de la P<sub>4</sub> inducido por el tratamiento (2, 4, 6).

El descenso de la temperatura corporal previo a la interrupción de la gestación parecería imitar, aunque de manera mas abreviada, los cambios endocrinológicos que ocurren durante la parición normal en la perra, en la cual la reducción de la temperatura rectal ocurre unas 10 a 24 horas previas al parto (1, 2). En este estudio, el descenso de la temperatura rectal registrado 16 horas previas a la observación clínica de la interrupción de la gestación resulta difícil de explicar en presencia de una progesteronemia con escasa variación. Se especula que el aglepristone podría también tener cierta acción hipotalámica uniéndose a los receptores de la P<sub>4</sub> a este nivel. No obstante, el eventual efecto hipotalámico de esta droga queda aun por definir.

Se concluye que el antiprogestágeno aglepristone resultó seguro y eficaz para interrumpir la gestación en este grupo de perras tratadas en condiciones controladas de campo. Las concentraciones de P<sub>4</sub> sérica no mostraron cambios significativos durante el protocolo. Sin embargo, la temperatura rectal descendió conjuntamente con la interrupción de la gestación. De este modo, la temperatura podría utilizarse para el monitoreo clínico del tratamiento actuando como predictor del momento en que ocurrirá la interrupción de la gestación en perras tratadas con esta droga.

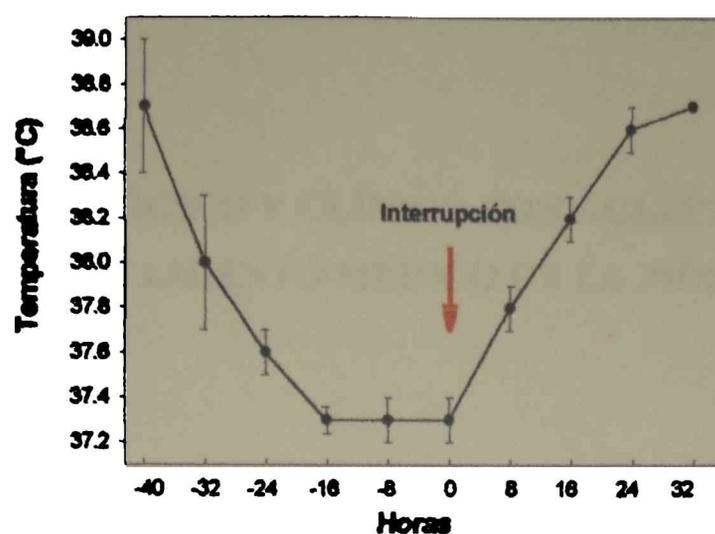
## **Bibliografía**

1. BLEICHER, N. (1962). Behavior of the bitch during parturition. J Am Vet Med Ass. 140: 1076-1082.
2. CONCANNON, P.W.; BUTLER, W.R.; HANSEL, W. (1978). Parturition and lactation in the bitch. Serum progesterone, cortisol and prolactin. Biol. Reprod. 19: 1113-1118.
3. COUZINET, B.; LESTRAT, N.; ULMANN, A.; BEAULIEU, E.E.; SCHAISON, G. (1986). Termination of early pregnancy by the progesterone antagonist RU 486 (Mifepristone). New England Journal of Medicine. 325: 1565-1570.

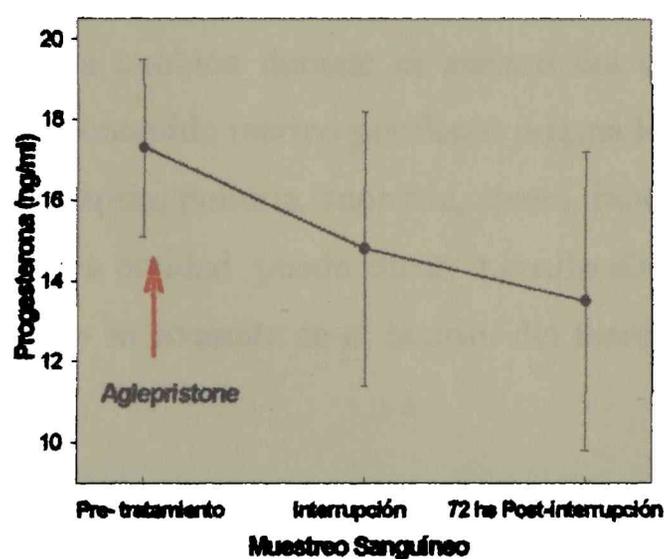
4. FIENI, F.; MARTAL, J.; MARNET, P.G.; SILIART, B.; BERNARDS, F.; RIO, M.; BRUYAS, J.F.; TAINTURIER, D. (2001). Hormonal variation after early and mid pregnancy termination in bitches with aglepristone (RU 534). *J Reprod Fertil Suppl.* 57: 243-8.
5. FIENI, F.; TAINTURIER, D.; BRUYAS, J.F.; BADINAND, F.; BERTHELOT, X.; RONSIN, P.; RACHAIL, M.; LEFAY, M.P. (1996). Etude clinique d'une anti-hormone pour provoquer l'avortement chez la chienne. *Recueil de Medecine Veterinaire.* 172: 359-367.
6. GALAC, S.; KOOISTRA, H.S.; BUTINAR, J.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VOOTHOUT, G.; OKKENS, A.C. (2000). Termination of mid-gestation pregnancy in bitches with aglepristone, a progesterone receptor antagonist. *Theriogenology.* 53: 941-950.
7. GOBELLO, C.; CASTEX, G.; CORRADA, Y.; KLIMA, L.; DE LA SOTA, L.; RODRÍGUEZ, R. (2002). Use of Prostaglandins and Bromocriptine Mesylate for Pregnancy Termination in Bitches. *J Am Vet Med Ass.* 220 (11): 1017-1019.
8. LINDE-FORSBERG, C.; KINDAHL, H.; MADEJ, A. (1992). Termination of mid-term pregnancy in the dog with oral 486. *J Sm Anim Prac.* 33: 331-336.
9. MATTOON, J.S.; NYLAND, T.G. (1995). Ultrasonography of the genital system. En: Nyland JS, Mattoon TG, eds. *Veterinary diagnostic ultrasound.* W.B. Saunders Co. 141-164.
10. ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J.P. (1999). Comparison of different combinations of analogues of PGF $2\alpha$  and dopamine agonists for the termination of pregnancy in dogs. *Vet Rec* 10; 144 (15):416-419.
11. PHILIBERT D. (1994). RU 46534, Affinité relative de liaison pour les récepteurs stéroïdiens-activité antiprogestérone *in vivo*. Rapport d'étude interne Roussel Uclaf. 127-128.
12. TAINTURIER, D.; CLOCART, F.; FIENI, F.; BRUYAS, J.F.; BATTUT, I. (1997). Le suivi de la gestation chez la chienne. *Rec Med Vet.* 174 (314): 77-85.

Perra	Día del servicio	Días hasta la interrupción	Aborto/ Resorción	Glándulas mamarias	Efectos colaterales
Golden retriever	37	3	Aborto	Normal	No
Boxer	42	2	Aborto	Normal	No
Ovejero Alemán	28	4	Resorción	Normal	No
Dóberman	33	5	Resorción	Agrandamiento y Secreción láctea	No
Bull terrier	30	3	Resorción	Normal	No
Mestiza	25	5	Resorción	Agrandamiento y Secreción láctea	No
Shar-pei	30	7	Resorción	Normal	No
Pastor del Cáucaso	35	2	Resorción	Normal	No
Bloodhound	37	2	Aborto	Agrandamiento y Secreción láctea	No

**Tabla 1:** Resultados individuales de 9 perras con 25 a 45 días de gestación tratadas con 2 dosis de 10 mg/kg de aglepristone para interrumpir la gestación.



**Figura 1:** Media de la temperatura rectal de 9 perras con 25 a 45 días de gestación tratadas con 10 mg/kg SC cada 24 h de aglepristone tomada cada 8 horas. Las barras sobre los símbolos representan los valores de SEM.



**Figura 2:** Media de las concentraciones séricas de P<sub>4</sub> de los mismos animales de la Figura 1 previo a la administración del aglepristone, en el momento de la interrupción clínica de la gestación y a la 72 horas de la misma. Las barras sobre los símbolos representan los valores de SEM.

## CAPÍTULO VII



### ESTUDIO ENDOCRINOLÓGICO Y CLÍNICO CON AGLEPRISTONE Y CLOPROSTENOL EN EL TRATAMIENTO MÉDICO DE LA PIÓMETRA CANINA

#### Introducción

El complejo hiperplasia endometrial quística-piómetra (HEQ-P) es una frecuente enfermedad del tracto reproductivo de la perra entera. Esta afección se halla íntimamente relacionada a la elevada progesteronemia característica del diestro canino (13). Asimismo, se cree que la secuencia de una dominancia estrogénica, seguida de una prolongada progesteronemia induciría a la HEQ, predisponiendo de este modo al posterior desarrollo de piómetra (4). Si bien es una enfermedad característica del diestro canino, es posible encontrarla también durante el anestro del ciclo estral (1, 7, 13, 17). La toxemia resultante de la presencia de contenido uterino purulento origina los signos clínicos característicos de este síndrome, especialmente polidipsia, poliuria, anorexia, apatía, shock y muerte. Dependiendo del estado de permeabilidad de la cérvix esta entidad puede cursar a cuello abierto o cerrado. En la piómetra a cuello cerrado el contenido purulento se acumula en el interior del útero, siendo el curso de la enfermedad más agudo y grave.

El tratamiento tradicionalmente empleado es el quirúrgico mediante ovariectomía, provocando el final de la vida reproductiva de la perra. Por esta razón, un tratamiento médico eficaz es necesario para hembras de valor reproductivo. Las prostaglandinas (PG) y los antiprogestágenos demostraron ser eficaces para este fin (1, 2, 12, 15, 16). La administración de PG ocasiona contracciones miométricas, eventual relajación cervical y efecto luteolítico luego del día 5 del diestro, disminuyendo las concentraciones séricas de  $P_4$  (17). El cloprostenol sódico es un análogo sintético de la  $PGF_{2\alpha}$  con efecto luteolítico y actividad uterotónica (16, 17).

Los antiprogestágenos son esteroides sintéticos que se unen con gran afinidad a los receptores de  $P_4$ , sin ocasionar ninguno de los efectos propios de la  $P_4$  (10, 11). El aglepristone (RU 534) es un antiprogestágeno disponible en el mercado veterinario de ciertos países, que compite en la perra por los

receptores uterinos con una tasa de fijación 3 veces superior al de la P<sub>4</sub> endógena (14). En humanos una combinación de antiprogestágenos y PG se ha utilizado con éxito para inducir el aborto (3).

Según lo reportado recientemente en 2 estudios, la combinación de PG y aglepristone ha demostrado tener mejores resultados para el tratamiento de la HEQ-P canina que el uso separado de estas drogas (5, 8). En el primero de estos ensayos, perras tratadas con la combinación terapéutica tuvieron una mejora del 22 % y 32 % en el porcentaje de éxito al día 14 y 28, respectivamente que las tratadas con monodrogas (8). Aunque podría potencialmente resultar útil conocer las concentraciones séricas de P<sub>4</sub> durante estos protocolos combinados, éstas no han sido descritas. Por otra parte, son necesarios estudios adicionales para poner a punto la administración óptima de estos tratamientos combinados.

El objetivo de este capítulo consistió en comparar la eficacia clínica y la seguridad de la administración de distintos protocolos combinados de cloprostenol y aglepristone para el tratamiento de la CEH-P en la perra, y describir los perfiles séricos de P<sub>4</sub>, antes y durante el tratamiento.

## **Materiales y Métodos**

### *Animales*

Veintiuna perras con HEQ-P a cuello abierto (n=15) o cerrado (n=6) se incluyeron en este estudio. La HEQ-P se definió como la presencia de un útero agrandado de tamaño, con contenido líquido en su interior con o sin presencia de descarga vaginal. El diagnóstico de HEQ-P fue confirmado por los hallazgos típicos ultrasonográficos (18). Se incluyeron exclusivamente perras que luego de la restauración de la hidratación tuvieron valores de urea y creatinina sérica < 60 mg/dL y 1.5 mg/dL, respectivamente. Todos los propietarios firmaron un consentimiento para incluir a sus animales en el estudio.

### *Protocolos terapéuticos*

Las perras se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes protocolos terapéuticos:

- **Tratamiento I** (TRT I; n = 10 [abiertas (n=7) y cerradas (n=3)]) aglepristone (Alizine®, Virbac, Francia) 10 mg/kg SC los días 1, 2, 8 y 15 (si no curó completamente), y cloprostenol (Estrumate®, Schering Plough, Argentina) 1µg/kg SC los días 3 y 8 de tratamiento alejado de las comidas.
- **Tratamiento II** (TRT II; n=11 [abierta (n=8) y cerrada (n=3)]) ídem aglepristone y cloprostenol 1µg/kg SC los días 3, 5, 8, 10, 12 y 15 (si no curó completamente) de tratamiento.

El día 1 fue considerado como el día del examen y diagnóstico inicial de la perra. Durante los protocolos terapéuticos se administró a todas las perras una combinación de amoxicilina y ácido clavulámico en dosis de 12.5 mg/kg oral (Clavamox®, Pfizer, la Argentina) y se realizó hidratación de apoyo.

#### *Seguimiento clínico y ultrasonográfico*

Antes de comenzar cada tratamiento (día 1) y luego en los días 3, 8, 15 y 29 (si no curó completamente) se evaluó en la totalidad de los animales el peso corporal, la temperatura, la hidratación, la presencia de anorexia y poliurio-polidipsia, el diámetro uterino total y de la luz determinados por ultrasonografía (Toshiba Core Visión Pro, Shimoishigami, Otawara-Shi, Tochigi-Ken, Japan, transductor de 3.7 o 5 MHz microcónvex) y la presencia de descarga vulvar. Los animales fueron también observados por la eventual aparición de efectos adversos durante los protocolos experimentales. Todas las perras fueron controladas hasta su siguiente ciclo estral pos tratamiento.

#### *Muestreo sanguíneo y dosaje hormonal*

Antes de comenzar cada tratamiento (día 1) y luego en los días 3, 8, 15 y 29 (si no curó completamente) se tomaron muestras sanguíneas en la totalidad de los animales para realizar hemograma, urea, creatinina y la determinación de la concentración de P<sub>4</sub> sérica.

Las concentraciones de P<sub>4</sub> fueron determinadas por medio de radioinmunoensayo de fase sólida (Coat-A-Count, DPC; Los Angeles, CA). La sensibilidad al 95% fue de 0.1ng/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 5.1 y 8.8, respectivamente.

#### *Análisis Estadístico*

Los datos de la frecuencia de perras que alcanzaron el éxito del tratamiento (definido como la recuperación de la salud general y observación ultrasonográfica del útero normal, 18) y presencia de

efectos secundarios, tanto para los TRT I o II, o perras con valores iniciales de P<sub>4</sub> sérica basales o no, se analizaron por el test de *chi*<sup>2</sup>. Para este propósito la P<sub>4</sub> sérica al día 1 fue categorizada como basal o no basal (< o > 1.2 ng/ml, respectivamente; 12). El porcentaje de cambio de la concentración de P<sub>4</sub> sérica [(valor final [días 8, 15 o 29] – valor inicial [día 1] / valor inicial) x 100 fue analizado por ANOVA. El modelo matemático incluyó el efecto principal del TRT (I o II) y el día (8, 15, 29) y la interacción del tratamiento por el día. Se realizó también estadística descriptiva de todos los parámetros cuantitativos evaluados. El nivel de significancia se fijó en  $p < 0.05$ .

## **Resultados**

Nueve de las 10 perras del TRT I alcanzaron el éxito el día 15 (8/10) o 29 (1/10), mientras que la restante (1/10) murió el día 4 por razones ajenas al tratamiento y a la patología de base. Diez de las 11 perras del TRT II obtuvieron el éxito al día 15 (8/11) o 29 (2/11), mientras que 1 perra (1/11) no lo alcanzó el éxito al día 29 de tratamiento. No se encontraron diferencias significativas en el éxito entre ambos tratamientos ni concentraciones iniciales de P<sub>4</sub>.

Ninguna de las perras mostró efectos secundarios locales o sistémicos en relación a las drogas (0/21). La descarga vulvar se incrementó en las perras con HEQ-P abierta dentro de las 24 a 48 horas luego de la primera administración de aglepristone con mejoría general clínica. En tanto, todas las hembras que padecían HEQ-P cerrada abrieron el cuello uterino dentro de las 24-48 horas con aparición de abundante descarga vulvar y notable mejoría del estado general.

La temperatura corporal, hidratación, apetito y polidipsia - poliuria comenzaron a mejorar marcadamente hacia la normalidad a partir del día 3 en las perras de ambos tratamientos. Los parámetros del hemograma tuvieron una clara tendencia a normalizar sus valores hacia el final de los tratamientos, encontrándose ya en ese momento los glóbulos blancos dentro de los valores normales (Figura 1).

Los diámetros uterinos disminuyeron al tamaño normal y la luz se tornó imperceptible o sin contenido en los días 15 o 29 del protocolo en las perras que alcanzaron el éxito en ambos grupos de tratamiento (Figura 2).

Las concentraciones séricas de  $P_4$  antes y durante los tratamientos I y II en las perras con la  $P_4$  basal (n=9) y no basal (n=12) se representa en la Figura 3. La  $P_4$  mostró una tendencia a descender sus valores en 3 de los 4 subgrupos. Una interacción significativa entre el día y el tratamiento fue hallada para el porcentaje de cambio de la  $P_4$  cuando se consideraron tanto el grupo con  $P_4$  basal o el no basal.

La recidiva de HEQ-P en el siguiente ciclo estral de las 19 perras que alcanzaron el éxito ocurrió en 3 de las perras más viejas (7 a 15 años de edad); dos de ellas habían tenido más de 2 episodios anteriores de HEQ-P. Una perra fue ovariectomizada antes de su ciclo siguiente. Una de las hembras que no desarrollaron recidiva, de 2 años de edad, fue servida y parió una camada normal.

## Discusión

En este estudio, la proporción de perras con concentraciones iniciales basales de  $P_4$  fue más alta que lo reportado en dos estudios anteriores (1, 8). Aunque esto puede ser un hecho probablemente incidental, confirma que este complejo puede ser clínicamente evidente tanto durante el diestro como durante el anestro canino (6, 15).

En línea con un estudio reciente, pero en discordancia con otro previo en el cual sólo se utilizó aglepristone, en el presente ensayo no se encontró ninguna relación entre las concentraciones iniciales basales de  $P_4$  y el éxito del tratamiento (8, 11). Más aún, algunas perras curaron sin tener concentraciones séricas de  $P_4$  basales al finalizar el tratamiento. Coincidentemente, la terminación de la preñez con aglepristone en la perra ocurre en presencia de altas concentraciones séricas de  $P_4$  (9). Estos resultados parecen confirmar que los antiprogéstágenos disminuyen la  $P_4$  intrauterina a través de la disminución del número de receptores  $P_4$  o la sensibilidad de ellos, y no a través de la disminución de las concentraciones séricas de esta hormona (9). El pico de  $P_4$  inicial (en el día 8) del grupo no basal se podría explicar por el bloqueo de los receptores uterinos y la consiguiente elevación de la  $P_4$  sanguínea. Más difícil de interpretar es la mejoría clínica en perras con concentraciones basales de  $P_4$  a lo largo del tratamiento. Aunque en estos casos, el efecto uterotónico de la PG podría haber influenciado positivamente. No obstante, la mejoría clínica y el aumento en la descarga vaginal aparecieron antes del primer tratamiento con PG, en el día 3. Si bien en el presente estudio el cloprostenol fue administrado cada 48 horas o a intervalos más largos, los resultados al día 15 (8/10 y 8/11 para TRTI y TRTII, respectivamente) fueron mejores que los reportados en otro estudio (50 %), donde se utilizó la misma dosis pero en forma diaria (9).

En el presente trabajo, el número de aplicaciones de cloprostenol no pareció ser crucial para la resolución de los casos clínicos, aunque sería necesario un número mayor de perras a fin de confirmar o rechazar estos resultados iniciales.

En discordancia con 2 estudios recientes (9, 17) pero en línea con un reporte previo en el cual solo se utilizó aglepristone (2), en este estudio no se reportó ningún efecto secundario. La administración de una dosis baja de esta potente PG lejos de la comida, pudo haber marcado la diferencia. Por otra parte, todas las perras estuvieron en mejores condiciones en el día de la primera inyección de cloprostenol (día 3) que al principio de los tratamientos.

La tasa de recidiva en este trabajo fue más alta que en un reporte previo similar en el cual ninguna de 12 perras desarrolló HEQ-P en el siguiente ciclo estral (9), y también más elevado que en un estudio en el cual sólo el aglepristone fue utilizado (11). La tasa más alta de recidiva puede deberse a la edad avanzada de alguna de las perras utilizadas en este ensayo. Inversamente, estos resultados tuvieron un rango más bajo de recurrencia que las perras tratadas sólo con PG (10-77 %; 12, 15). Estos hallazgos sugieren que el efecto uterotónico de la PG no revierte la HEQ y muchas perras tratadas únicamente con PG podrían tener una disminución de los signos clínicos a niveles subclínicos. Se hipotetiza que el tratamiento con antiprogestágenos podría manejar mejor las anomalías endometriales dependiendo de la profundidad de la infiltración inflamatoria medida usando la clasificación de Dow (6). Inversamente, un estudio, en el cual se realizó un examen histológico de los úteros, no reveló ninguna diferencia entre 6 días de tratamiento con un antiprogestágeno y úteros de perras control (1).

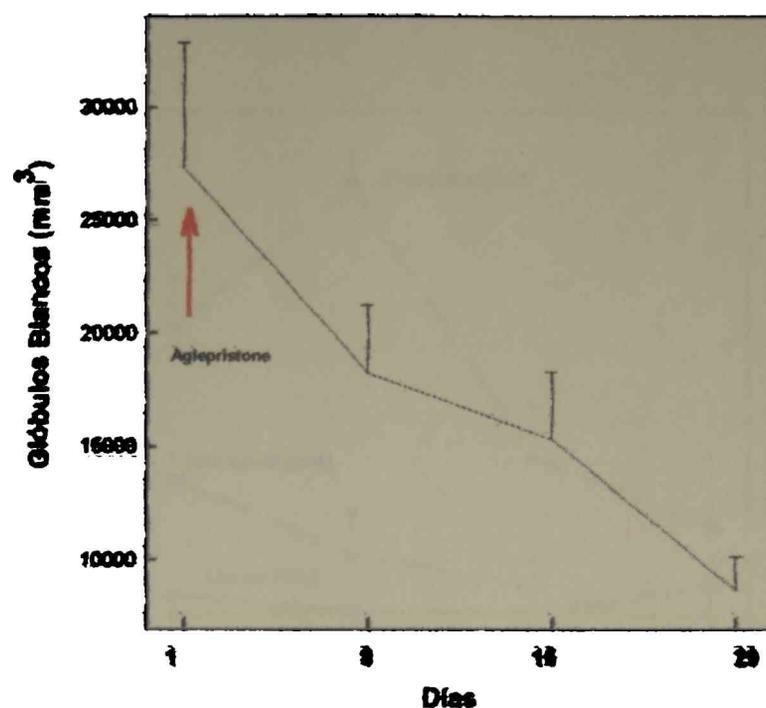
En concordancia con un reporte previo (2), la fertilidad después del tratamiento no pareció verse afectada en la perra joven que recibió servicio. Esta perra joven fue representativa de la población para quienes están dirigidos estos protocolos en la práctica clínica. Se requieren mayor cantidad de estudios que incluyan un número grande de perras de diversas edades, con o sin episodios anteriores de HEQ-P para evaluar la fertilidad después del tratamiento.

Se concluye que estos protocolos combinados mostraron ser eficientes para revertir los signos clínicos y ultrasonográficos uterinos anormales en la mayoría de las perras que sufrían HEQ-P, independientemente de las concentraciones séricas iniciales de  $P_4$ . Asimismo, el número de administraciones de PG parecieron tener cierto efecto sobre las concentraciones séricas de  $P_4$ .

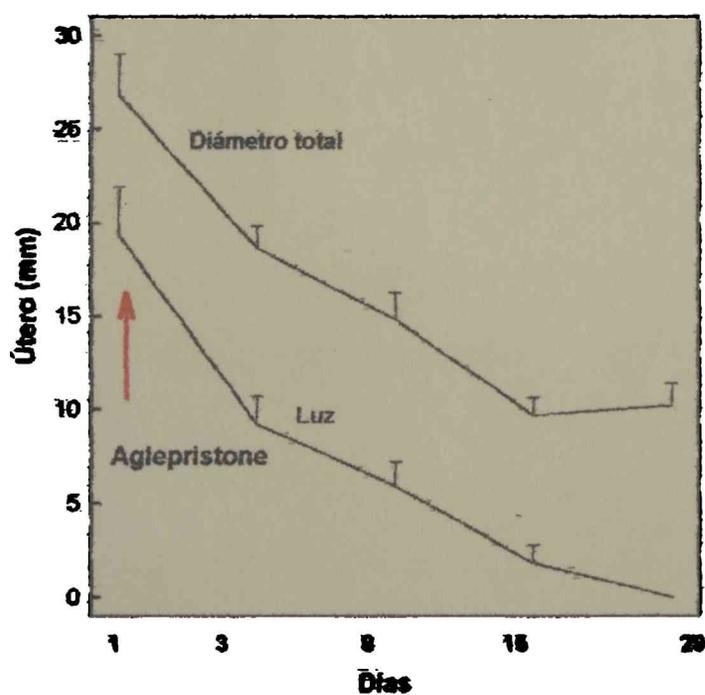
## **Bibliografia**

1. BLENDINGER, K.; BOSTEDT, H.; HOFFMANN, B. (1997) Hormonal effects of the use of an antiprogestin in bitches with pyometra. *J Reprod Fertil Suppl.* 51:317-325.
2. BREITKOPT, M.; HOFFMANN, B.; BOSTEDT, H. (1997) Treatment of pyometra in bitches with an antiprogestin. *J Reprod Fertil Suppl.* 51:327-31.
3. CADEPOND, F.; ULMANN, A.; BEAULIEU, E.E. (1997) RU 486 (mifepristone): mechanism of action and clinical uses. *Ann Rev Med.* 48:129-156.
4. CHEN, Y.M.M.; WRIGHT, P.J.; LEE, C.S. (2001). A model for the study of cystic endometrial hyperplasia in bitches. *J Reprod Fertil (Suppl).* 57: 407-414.
5. CORRADA, Y.; CASTEX, G.; KLIMA, L.; RODRÍGUEZ, R.; GIANNONI, M; GOBELLO, C. (2002) A study of two combined protocols of aglepristone and cloprostenol to treat open cervix pyometra in the bitch. *Proceedings Annual Symposium of European Society of Small Animal Reproduction. Liege, Bélgica.* 130-131.
6. DOW, C. (1959) The cystic hyperplasia – pyometra complex in the bitch. *J Comp Pathol.* 69:237-250.
7. DOW, C. (1977) The cystic hyperplasia – pyometra complex in bitch. *Vet Rec.* 1977; 69:1409-1415.
8. FIENI, F.; BRUYAS, D.; TAINTURIER, D.; BATTUT, I. (2001) Clinical use of antiprogestins in the treatment of metritis /pyometra in the bitch. En: *Proceedings de la 5ta Conferencia Annual de la Society of Domestic Animal Reproduction, Vienna Austria.*
9. FIENI, F.; MARTAL, J.; MARNET, P.G.; SILIART, B.; BERNARD, F.; RIOU, M.; BRUYAS, J.F.; TAINTURIER, D. (2001) Hormonal variations in bitches after early or mid pregnancy termination with aglepristone (Ru 534). *J Reprod Fertil Suppl.* 57:243- 248.
10. HOFFMANN, B.; LEMMER, W.; BOSTEDT, H.; FAILING, K. (2000) Application of the antiprogestin aglepristone for the conservative treatment of pyometra in the dog *Tierarztl Prax.* 28:323-329.
11. HOFFMANN, B.; SCHULER, G. (2000) Receptor blockers- general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Anim Reprod Sci* 60-61: 295-312.
12. NELSON, R.W.; FELDMAN, E.C.; STABENFELDT, G.H. (1982) Treatment of canine pyometra with PG F2 $\alpha$ . *J Am Vet Med Assoc.* 181:899-903.
13. NOAKES, D.E.; DHALIWAL, G.K.; ENGLAND, G.C. (2001) Cystic Endometrial hyperplastic/pyometra in dogs: a review of the causes and pathogenesis *J Reprod Fertil Suppl.* 57:395-406.

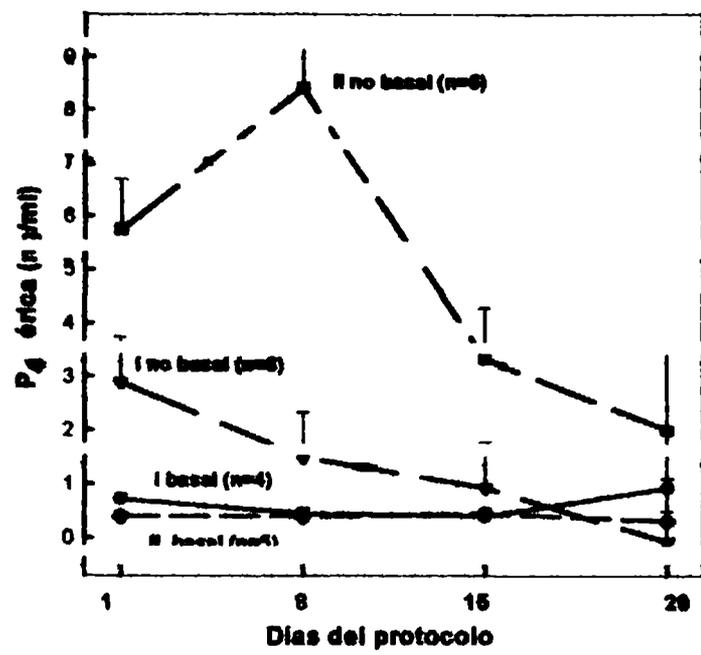
14. PHILIBERT, D. (1994) RU 46534. Affinité relative de liaison pour les récepteurs stéroïdiens - activité antiprogéstérone in vivo. Rapport d'étude interne Roussel Uclaf. 4.
15. RENTON, J.P.; BOYD, J.S.; HARVEY, M.J. (1993) Observation of the treatment and diagnosis of open pyometra in the bitch. J Reprod Fertil Suppl. 47:465- 469.
16. TAINTURIER, D.; TREBOZ, D. (1985) Traitement del la metrite chronique de la chienne para un analogue de la F2 $\alpha$ . Prat Med Chir Anim Comp 20:239- 244.
17. VAN DER HORST, C.J.; VOGEL, F. (1977) Some effects of PG F2 $\alpha$  on corpora lutea and on the uterus in the cycling dog. Tijdschr Dierge-neesk. 102:117-123.
18. YEAGER, A. E.; CONCANNON, P. (1995) Ultrasonography of the reproductive tract of the female dog and cat. En: BONAGURA, J.D.; KIRK, K.W. (eds): Current Veterinary Therapy XII. Philadelphia: WB Saunders. 1040-1052.



**Figura 1:** Media de glóbulos blancos de 21 perras con hiperplasia endometrial quística - piómetra tratadas con 2 protocolos combinados de prostaglandina y aglepristone antes y durante el tratamiento. Ambos grupos de tratamientos se representaron en conjunto debido a que no se hallaron diferencias significativas entre ellos. Las barras sobre los símbolos representan los valores de SEM.



**Figura 2:** Media del diámetro uterino total y de la luz determinada por ultrasonografía en todos los animales de la Figura 1 antes y durante los tratamientos. Las barras sobre los símbolos representan los valores de SEM.



**Figure 3:** Media de las concentraciones séricas de  $P_4$  de todos los animales ( $n= 21$ ) divididos en 4 subgrupos de acuerdo al tratamiento (I o II) y a la concentración inicial (día 1) de  $P_4$  (basal o no basal,  $< 0 \geq 1.2$  ng/mL, respectivamente) antes y durante el tratamiento. Las barras sobre los símbolos representan los valores de SEM.

## CONCLUSIONES FINALES

- El rango de referencia de prolactina sérica (PRL) en los caninos machos de las razas Ovejero Alemán, Beagle y caninos mestizos se estableció desde valores no detectables hasta 6.0 ng/ml.
- Se debe tener precaución al extrapolar los resultados de PRL sérica entre los caninos machos de las diferentes razas debido a que se hallaron diferencias significativas entre las diferentes razas estudiadas.
- La PRL tiene una ritmicidad circanual en perros machos del hemisferio sur. Existiendo un ascenso de las concentraciones de PRL sérica con el aumento de las horas de luz, alcanzando valores pico en los meses de verano. Las concentraciones más bajas de esta hormona se hallaron en el otoño e invierno temprano.
- La secreción de PRL sérica en caninos machos presenta un patrón pulsátil el cual debe considerarse al momento de tomar muestras con fines clínicos o experimentales.
- La administración del agonista dopaminérgico cabergolina durante el anestro resultó un método eficiente, seguro, y fácil para inducir ciclos estrales fértiles y para acortar los intervalos interestro en perras.
- Los protocolos combinados del agonista dopaminérgico bromocriptina y la prostaglandina cloprostenol resultaron eficientes y seguros para interrumpir la gestación no deseada.
- El antiprogéstágeno aglepristone resultó seguro y eficaz para interrumpir la gestación no deseada en perras. Las concentraciones de  $P_4$  sérica no mostraron cambios significativos durante el tratamiento. La temperatura rectal descendió un promedio de 16 horas previas a la interrupción, resultando un parámetro de utilidad para el monitoreo clínico del tratamiento.

- **Los protocolos combinados del antiprogéstágeno aglepristone con la prostaglandina cloprostenol resultaron efectivos y seguros para revertir los signos clínicos y ultrasonográficos uterinos de perras con HEQ-P, independientemente de las concentraciones séricas iniciales de progesterona.**