



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

TESIS DOCTORAL

M.V. ANALÍA L. RISSO

2012



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

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**USO DE ANÁLOGOS DE LA GNRH EN EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN
INDESEADA EN LOS FELINOS DOMÉSTICOS**

AUTOR: RISSO, Analía Lorena, MV
DIRECTOR: GOBELLO, Cristina, DMV, DECAR
CODIRECTOR: CORRADA, Yanina Alejandra, DMV

**LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Nutrición Mineral y Fisiología Reproductiva,
Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP**

MIEMBROS DEL JURADO:

Dr. **NAGLE**, Carlos
Dra. **FARINATI**, Zulema
Dra. **FURNUS**, Cecilia

Año 2012

*“A mi familia”
por estar siempre...*

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mi directora, Cristina Gobello, quien me abrió las puertas al mundo de la investigación, y a través del cual pude descubrir lo que me gusta y quiero hacer, por su gran compromiso y dedicación.

- ❖ A mi codirectora, Yanina Corrada, quien me acompañó siempre, por confiar, brindarme su apoyo y tiempo, por sus consejos, su gran predisposición y honestidad, por ser una gran persona.

- ❖ A mi esposo Leo y mi hija Valentina, por estar a mi lado apoyándome, por acompañarme y entenderme, por sus palabras de aliento y sobre todo, por su amor que me fortalece día a día.

- ❖ A mi gran familia, mamá, papá, Carla, Oscar, hermanos, por la ayuda que me brindaron, para que pudiera formarme y crecer académicamente, por el esfuerzo enorme que hicieron siempre por mí.

- ❖ Al Dr. Alejandro Relling, quien se acercó para brindarnos su apoyo, por sus consejos, su enseñanza, su preocupación y ayuda desinteresada para que pueda realizar este trabajo.

- ❖ A mis compañeros de trabajo Car, Merce, Anita, Jorge, Eli, Pablo y Patricio, por su colaboración y ayuda durante mi trabajo, a Guada gracias por su compañerismo, por su sinceridad y sobre todo por su amistad.

- ❖ A mis amigas Lore, Sole, Lau, mis hermanas del corazón, gracias por estar siempre.

- ❖ Al Dr. Eduardo Desmarás y al Doctor Guillermo Matioli por proporcionarme un espacio en la Cátedra de Fisiología para poder realizar mi trabajo.

- ❖ Al Servicio de Diagnóstico por Imágenes, especialmente a Paula, por la ayuda brindada a través de los estudios ecográficos realizados a los animales experimentales.

- ❖ Al Dr. Claudio Barbeito por su participación en este trabajo, por su preocupación y por estar siempre predispuesto.

- ❖ A la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), de la cual fui becaria de iniciación.

- ❖ A la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por otorgarme una beca de Perfeccionamiento para finalizar mis estudios de doctorado.

- ❖ Al Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas “Norberto Quirno” (CEMIC), por brindarme la oportunidad de realizar una pasantía y de esa forma acrecentar los conocimientos necesarios para mi trabajo.

- ❖ Al Contraception & Reproductive Health Branch Center for Population Research, NIH, USA, por la provisión de acyline.

- ❖ A Peptech Animal Health, Australia, por la provisión del acetato de deslorelina.

- ❖ A la Morris Animal Foundation, por el apoyo brindado a esta investigación.

- ❖ A todos los propietarios que me permitieron realizar los seguimientos y disponer de sus mascotas, por la predisposición y confianza que me tuvieron.

- ❖ A la colonia experimental felina y a todos los animales que participaron, gracias por estar siempre dando alegría a nuestra vida.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

Publicaciones en revistas internacionales

- ❖ **Risso A**, Valiente C, Corrada Y, García Romero G, Blanco P, de la Sota PE, Diaz J, Gobello C. The GnRH antagonist acyline prevented ovulation, but did not affect ovarian follicular development or gestational corpora lutea in the domestic cat. *Theriogenology* 2010; 73:984-7
- ❖ **Risso A**, Corrada Y, Barbeito C, Diaz J, Gobello C. Long term release GnRH agonists postpone puberty in domestic cats. *Reproduction in Domestic Animals* (en prensa).

Publicaciones en revistas nacionales

- ❖ **Risso A**, Iglesias M, García Romero G, Valiente C, Diaz J, Corrada Y, Gobello. Validación biológica de la técnica de extracción a campo de estradiol fecal en el gato doméstico (*Felis catus*) *Invet.* 2010; 12(1): 53-8
- ❖ **Risso A**, de la Sota PE, García P, Díaz J, Corrada Y, Blanco PG, Gobello C. Validación biológica de la técnica de extracción a campo de progesterona fecal en el gato doméstico (*Felis catus*) *Analecta Veterinaria* 2010; 30 (2): 28-31

Presentaciones en congresos nacionales e internacionales

- ❖ **Risso A**, Corrada Y, de la Sota P, Abeyá M, García P, Gobello C. Effect of deslorelin implants on domestic queens puberty: preliminary report. Annual Conference Society of Theriogenology. Milwaukee, Wisconsin, USA. 9-13, 2011 (resumen)

- ❖ **Risso A**, de la Sota P, Díaz J, Jiménez A, Juarez E, Gobello C. Effect of the GnRH antagonist, acyline, on estrous cycle and pregnancy in the domestic cats Morris Animal Foundation's Annual Meeting, Denver, Colorado , USA 24 – 26, 2010 (resumen)

- ❖ **Risso A**, de la Sota P, Díaz J, Jiménez A, Juarez E, Gobello C. Effect of the GnRH antagonist, acyline, on early estrous cycle and gestation in the domestic cat. Encuentro BIANUAL del European Veterinary Small Animal Association. (EVSSAR) 7th Congress in Louvain-La-Neuve Bélgica, 14-15, 2010 (resumen)

- ❖ **Risso A**, García Romero G, Corrada Y, Sirini M, Carranza A, Abeyá M, de la Sota P, García P, Valiente C, Díaz J, Gobello C. El agonista de GnRH, acetato de deslorelina, pospone la pubertad en la gata doméstica: reporte preliminar. 7mas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica 2 y 3/9-2011 (resumen).

- ❖ **Risso A**, Valiente C, Corrada Y, García Romero G, de la Sota P, García P, Díaz J, Gobello C. Biological validation of a simple extraction method for fecal sexual steroids in the female cat. Jornadas de investigadores jóvenes en ciencias veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Buenos Aires. Seleccionado para presentación oral. Premio al mejor trabajo presentado en el área de clínica de pequeños y grandes animales. 6-2011

- ❖ **Risso A**, Valiente C, Corrada Y, García Romero G, Díaz J, Blanco P, Gobello C. El antagonista de GnRH acyline no afecta el cuerpo lúteo gestacional del gato doméstico. Congreso Nacional de la Asociación de Veterinarios especializados en animales de compañía de Argentina (AVEACA) 2010. Bs. As., Argentina (resumen)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	4
CAPÍTULO I	
<i>Interrupción del estro con el antagonista de GnRH, acyline</i>	10
CAPÍTULO II	
<i>Efecto del antagonista de GnRH, acyline en la gestación</i>	19
CAPÍTULO III	
<i>Postergación de la pubertad con el agonista de GnRH, deslorelina</i>	28
CAPÍTULO IV	
<i>Validación biológica del estradiol y progestágenos fecales en el gato doméstico (Felis Catus)</i>	39
CONCLUSIONES FINALES	50
ANEXOS	
PUBLICACIONES PARCIALES	52

ABREVIATURAS

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

FSH: hormona folículo estimulante

LH: hormona luteinizante

P₄: progesterona

im: intramuscular

sc: subcutánea

SEM: error estándar de la media

RIA: radioinmunoensayo

USO DE ANÁLOGOS DE GNRH EN EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN INDESEADA EN LOS FELINOS DOMÉSTICOS

Palabras claves: gato, antagonista de GnRH, agonista de GnRH, contracepción

RESUMEN

Debido a las características de su ciclo estral, los felinos domésticos (*Felis catus*) son sumamente prolíficos. Bajo el objetivo general de aportar al control de la reproducción en esta especie, los objetivos particulares de este trabajo de Tesis fueron: determinar la eficacia y la seguridad clínica del antagonista de GnRH de tercera generación, acyline, y de un agonista de GnRH de larga duración, el acetato de deslorelina, en distintos momentos reproductivos. El antagonista fue probado en el ciclo estral temprano, la ovulación, y en las distintas etapas de la gestación en gatas adultas. El agonista de larga duración se usó para probar su efecto en la postergación de la pubertad. Asimismo, se propuso validar biológicamente una técnica sencilla de extracción de estradiol y progesterona fecal para monitorear el ciclo estral. Una dosis única del acyline, no afectó el desarrollo folicular, pero inhibió la ovulación. Además, no interrumpió la gestación en ninguno de sus tercios, por lo que la LH no sería un factor luteotrófico esencial en la especie. Ninguno de los animales tratados presentó efectos colaterales locales ni sistémicos. El agonista de GnRH, acetato de deslorelina, pospuso la pubertad, sin alterar el crecimiento de los animales.

Por último, el método utilizado de extracción de esteroides sexuales en materia fecal permitió diferenciar las distintas etapas del ciclo estral felino, teniendo una alta correlación con la progesterona sérica y eventos fisiológicos representativos de hiperestrogenemia y progesteronemia.

USE OF GNRH ANALOGS IN THE CONTROL OF THE DOMESTIC CATS UNDESIRABLE REPRODUCTION

Key words: felids; GnRH antagonist; GnRH agonist; contraception

SUMMARY

Domestic cats (*Felis catus*) are a very prolific. To contribute to the control of reproduction in this species, the specific objectives of this thesis were: to test the efficacy and safety of the third generation GnRH antagonist, acyline, and the long term release GnRH agonist, deslorelin acetate. Acyline was assessed in the early estrous cycle, ovulation and on different stages of feline gestation. Deslorelin was used to postpone puberty. Furthermore, a simple extraction technique for fecal sexual steroids was biologically validated in the cat. A single GnRH antagonist dose did not affect follicular development, although it inhibited ovulation. Acyline did not affect gestation in any stage indicating, for the first time, that luteinizing hormone does not have a major luteotrophic role in this species. None of the treated animals presented local or systemic side effects. The GnRH agonist deslorelin postponed feline puberty without altering growth. The technique used to extract fecal sexual steroids permitted differentiation of the different stages of feline estrous cycle presenting also a high correlation with serum hormones and physiological events related to hyperestrogenemia and progesteronemia.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La gata doméstica (*Felis catus*), de acuerdo a su ciclo estral, es poliéstrica y generalmente estacional dependiendo en gran medida del fotoperíodo al que esté expuesta. La estación reproductiva, durante la cual presenta sucesivos ciclos estrales, incluye la primavera y el verano. Esto se relaciona con el aumento de la cantidad de horas de luz por día. Sin embargo, cuando la hembra es mantenida con 12-14 horas de luz en forma constante, cicla durante todo el año.

La gata presenta su primer celo entre los 7 y 9 meses de edad en promedio, con un rango que oscila entre los 5 y 12 meses. El comienzo de la actividad ovárica está influenciado por varios factores, en especial la cantidad de horas luz y el peso corporal. Como regla general, las gatas comienzan a ciclar con un peso de 2,3-2,5 kilos y en presencia de un mínimo de 12 horas de luz día (1-3).

Durante la estación reproductiva y siempre que no ocurra ovulación, la hembra felina presenta una sucesión de fases foliculares sin fases lúteas. Esta particularidad fisiológica de ciclos anovulatorios es posible ya que, en la gran mayoría de los casos, la ovulación en esta especie, es inducida por el coito. Si la ovulación ocurre y se produce la fertilización, comienza la gestación; si la fertilización fracasa se inicia una fase lútea que en la gata se denomina pseudogestación. Luego de cada fase folicular, gestación o pseudogestación, la hembra entra en un período corto de reposo sexual llamado interestro antes de retomar nuevamente la actividad sexual. En caso que la temporada reproductiva haya finalizado, la gata entra en período de reposo denominado anestro.

Debido a estas particularidades reproductivas, los felinos domésticos son sumamente prolíficos (4,5). En consecuencia, el control de la reproducción indeseada en esta especie constituye un problema sanitario y social severo (6,7).

El control de la reproducción indeseada en los felinos se puede llevar a cabo en forma permanente (esterilización quirúrgica) o transitoria/reversible (contracepción). Ambas opciones tienen indicaciones y contraindicaciones específicas, incluso puede ser necesaria una combinación en algunas circunstancias (8). El control reversible farmacológico de la reproducción (contracepción) en los felinos se ha realizado tradicionalmente con hormonas esteroideas. Los esteroides sexuales, además de no ser totalmente efectivos, provocan innumerables efectos adversos en el animal que no solo pueden anular el futuro reproductivo, sino también poner en riesgo su vida (9).

Un grupo de drogas, probadas en otras especies, con el propósito de controlar la reproducción de manera eficaz e inocua son los análogos de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). La GnRH es un decapeptido producido por el hipotálamo que actúa sobre sus receptores en la hipófisis. Esta hormona es liberada de manera pulsátil y posee una corta vida media de 2 a 5 minutos siendo rápidamente degradada por proteasas. La GnRH estimula en la hipófisis la producción y liberación de las gonadotrofinas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) las que, a su vez, actúan sobre las gónadas regulando la producción de esteroides, el desarrollo folicular, la ovulación, y la espermatogénesis (10,11).

Los análogos de la GnRH que incluyen agonistas y antagonistas, fueron producidos por la sustitución de aminoácidos en la molécula original de GnRH para crear moléculas con mayor potencia, duración y efectividad que la GnRH endógena (12). Esto se logró incrementando su afinidad por los receptores y/o disminuyendo su degradación o eliminación.

Los agonistas de la GnRH simulan la acción de la GnRH endógena estimulando la producción y liberación de gonadotrofinas por la hipófisis. La administración continua de agonistas desensibiliza la hipófisis de la acción de GnRH endógena inhibiendo finalmente la producción de LH y FSH. Por otro lado, los antagonistas actúan de manera diferente, uniéndose a los receptores hipofisarios y produciendo el bloqueo inmediato de los mismos. La principal ventaja de los antagonistas con respecto a los agonistas, es la de producir una rápida supresión de la hipófisis, sin la estimulación inicial que los agonistas provocan (flare up; 13-15).

Como contrapartida a la reproducción indeseada en el país, ha habido un incremento del número de gatos de raza, criados como animal de compañía o para la producción en criaderos. Este hecho ha provocado el crecimiento de la demanda de técnicas novedosas que permitan el mejoramiento y control reproductivo en la especie. Además, el gato doméstico es un excelente modelo experimental para el estudio de enfermedades humanas (16,17) y de nuevas biotecnologías reproductivas factibles de extrapolar a felinos silvestres en peligro de extinción (18).

Considerando la capacidad de los análogos de GnRH de controlar segura y eficazmente el eje gonadal, resulta de interés describir el efecto del antagonista de GnRH, acyline, y el agonista de liberación lenta, acetato de deslorelina, en distintas etapas de la reproducción felina.

El seguimiento hormonal del ciclo estral es necesario para la aplicación de distintos tratamientos, como también para evaluar el potencial reproductivo y el desarrollo de distintas técnicas de reproducción asistida. Por esta razón, resulta esencial el desarrollo de métodos prácticos y no invasivos para el monitoreo de la actividad endocrina en esta especie, como es la medición de metabolitos hormonales excretados en orina o heces (19). La validación biológica de la técnica de extracción de esteroides sexuales en materia fecal, en nuestro laboratorio, permitirá diferenciar

las etapas del ciclo estral felino, obteniendo datos de la endocrinología de los animales y efectos de tratamientos.

REFERENCIAS

1. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H. Reproducción y obstetricia en veterinaria. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill. Madrid; 1991.
2. Concannon PW, Lein DH. Feline reproduction. En: Kirk, R. W. (ed.). Current Veterinary Therapy VIII. Saunders, Philadelphia; 1983.
3. Dumon C. Reproduction in the feline species: Physiological particularities and practical consequences. XXIII Congreso de la Asociación Mundial de Medicina Veterinaria de Pequeños animales. Buenos Aires; 1998.
4. Griffin B. Prolific cats: the estrous cycle. Comp Contin Edu Pract Vet. 2001a; 23(12): 1049-56.
5. Griffin B. Prolific cats: the impact of their fertility on the welfare of the species. Comp Contin Edu Pract Vet. 2001b; 23(12): 1058-69.
6. Alliance for contraception in cats and dogs (ACCD). Proceedings Book of the International Symposium of Non surgical methods for pet population control. Georgia, USA 2002; Pp 110.
7. Alliance for contraception in cats and dogs (ACCD). Proceedings Book of the 2nd International Symposium of Non surgical methods for pet population control. Colorado, USA 2004; Pp 204.

8. Gobello C. Control temporal de los ciclos estrales En: Gobello C (ed). Temas de reproducción de pequeños animales por autores latinoamericanos. Intervet (ed) Argentina. 2004; 123 –8.
9. Munson L. Contraception in felids *Theriogenology*. 2006; 66: 126–34.
10. Hull ME, Kenigsberg DJ. Gonadotropin releasing hormone: function and clinical use. *Lab. Manag.* 1987; 25:51–8.
11. Jiang GC, Stalewski J, Galyean R, Dykert J, Schteingart C, Broqua P, y col. GnRH antagonists: a new generation of long acting analogues incorporating para-ureido-phenylalanines at position 5 and 6. *J. Med. Chem.* 2001; 44:453–67.
12. Padula AM. GnRH analogues-agonists and antagonists. *Anim. Reprod. Sci.* 2005; 88 (1–2):115–26.
13. Armer RE, Smell KH. Non-peptidic GnRH receptor antagonists. *Curr Med Chem.* 2004; 11 (22):3017-28.
14. Herbst KL. Gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2003; 3: 1–7.
15. Heber D, Dobson R, Swerdloff RS, Channabasavaiah K, Stewart JM. Pituitary receptor site blockade by a gonadotropin-releasing antagonist in vivo: mechanism of action. *Science* 1982; 216: 420–1.
16. O'Brien SJ, Nash WG, Winkler CA, Reeves RH. Genetic analysis in the domestic cat as an animal model for inborn errors, cancer and evolution. En: Migaki G, Desnick RJ, Patterson DF (eds.), *Animal Models of Inherited Metabolic Diseases*, *Prog. Clin. Biol. Res.* 1982; 94: pp. 67–90.

17. Fox PR, Maron BJ, Basso C, Liu SK, Thiene G. Spontaneously occurring arrhythmogenic right ventriculopathy in the domestic cat: a new animal model similar to the human disease. *Circulation*. 2000; 102: 1863–70.
18. Gañán N, Gomendio M, Roldan ER. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5 degrees con sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology*. 2009; 72: 1268-77.
19. Brown JL, Wasser SK, Wildt DE, Graham LH. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured non-invasively in feces. *Biol. Reprod*. 1994; 51: 776–86.

CAPITULO I

INTERRUPCIÓN DEL ESTRO CON EL ANTAGONISTA DE GNRH, ACYLINE

Introducción

Un aspecto importante en el control de la reproducción felina es la interrupción temprana de los ciclos estrales, especialmente durante el proestro y estro. Las hembras en estro frecuentemente son abandonadas como consecuencia de la ausencia o la falla en manejos contraceptivos previos. El control de la reproducción felina es también necesario cuando se aplican tecnologías de reproducción asistida. Está comprobado, en varias especies, que la supresión de la actividad ovárica antes de su estimulación (inducción de celos) aumenta el éxito de la misma (1).

Para la interrupción de la ciclicidad ovárica, se utiliza tradicionalmente, la administración seriada o de depósito de progestágenos. Estas hormonas sintéticas provocan gran cantidad de efectos colaterales en esta especie (2-4). Desafortunadamente, no se ha logrado aún en las gatas la prevención del ciclo estral de manera segura, eficaz y reversible. Por su parte, las hormonas no esteroideas, como los análogos de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), tienen un lugar prometedor en el futuro de la contracepción felina. En hembras caninas una única dosis del antagonista de tercera generación, acyline, interrumpió el estro sin efectos secundarios (5).

La información existente acerca del uso de antagonistas de GnRH en la supresión del ciclo estral felino es escasa y controversial. En un primer estudio, dos dosis de 6mg/kg separadas por 15 días, del antagonista de GnRH, antide, produjo la supresión breve del desarrollo folicular y la

ovulación, inhibiendo así el avance del ciclo estral (1). Más recientemente, el mismo antagonista en la misma dosis previno la ovulación, sincronizó las fases foliculares, pero no produjo una completa inhibición del ovario (6).

El objetivo de este capítulo fue determinar la eficacia y la seguridad clínica del antagonista de GnRH, acyline, en la prevención del ciclo estral temprano (proestro) y la ovulación en la hembra felina.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron 7 hembras felinas mestizas pospúberes, en buen estado de salud, en proestro espontáneo temprano (< 3 días desde el comienzo de los hallazgos típicos de comportamiento y citología vaginal; 7). Los animales se alojaron en gateras individuales expuestas a 10-14 hs de luz diaria, alimentadas con alimento balanceado comercial premium y agua *ad libitum* por lo menos 3 meses antes del comienzo del experimento. La totalidad del estudio tomó 12 meses.

Diseño experimental y protocolos farmacológicos

En un total de 24 proestros los animales se distribuyeron aleatoriamente en uno de los siguientes protocolos farmacológicos:

- GRUPO ACYLINE [ACY (n = 17 proestros)]: se administró acyline (Contraception & Reproductive Health Branch Center for Population Research, NIH, Bethesda, MD, USA) 330 µg/kg por vía subcutánea (sc).
- GRUPO PLACEBO [PLC (n=7 proestros)] se administró el correspondiente volumen de solución fisiológica por vía sc.

El acyline se encontraba en forma de polvo liofilizado, el cual se resuspendió en agua destilada hasta alcanzar una concentración de 2.2 mg/ml. La dosis usada se basó en estudios clínicos hechos en perras (5) y en estudios piloto en hembras felinas.

Todas las gatas se utilizaron en ambos grupos de tratamiento un mínimo de tres veces cada una. Los ciclos tratados fueron separados por periodos de “washed up” de un mínimo de dos ciclos estrales sin ningún tratamiento. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Cuidado de Animales de experimentación de la Facultad (CICUAL).

Seguimiento

El día después del tratamiento las hembras se alojaron con un macho fértil durante 48 horas realizando un seguimiento hasta la interrupción del celo. En el seguimiento se incluyó la observación del comportamiento (> 1 hora 2 veces al día) y citología vaginal (7). La finalización del estro se definió como la ausencia de comportamiento y de signos citológicos propios del

estro. También, se evaluó la posible aparición de efectos colaterales locales (edema en el sitio de inyección) y sistémicos (reacciones alérgicas, otros) relacionados a los tratamientos. Asimismo, se registraron los días hasta el comienzo del siguiente ciclo estral espontáneo pos tratamiento y los apareamientos observados.

Citología vaginal

Se colectaron frotis vaginales 3 veces por semana a través del periodo en estudio. La citología vaginal, como indicador indirecto de las concentraciones estrogénicas, se realizó mediante hisopos óticos embebidos en solución fisiológica. La tinción de los frotis se efectuó con Tinción 15 (Biopur, Rosario, Argentina). El porcentaje de cada tipo celular se determinó como se ha descrito previamente (8), y el 80% de células superficiales se consideró como estro.

Muestras de sangre y ensayos hormonales

Las muestras de sangre para la medición de progesterona (P_4) sérica se recolectaron por venopunción periférica 14 días después de la interrupción del estro para testear ovulación ($P_4 > 2$ ng/ml; 7). La P_4 sérica se determinó por duplicado mediante radioinmunoensayo (RIA) de fase sólida (Coat-A-Count, DPC®, Los Angeles, USA). Para este kit, la sensibilidad al 95% de unión fue de 0,1 ng/ml, y el CV intra-ensayo fue de 5,6 %.

Examen ultrasonográfico

Veinte días después de la separación de las hembras del macho, se realizó el examen ultrasonográfico (Toshiba Core Vision Pro, Japan, 8-MHz linear-array transducer) para diagnosticar gestación (9).

Análisis estadístico

El tiempo (días) hasta la interrupción del proestro y hasta el siguiente ciclo estral después del tratamiento se analizó y se comparó entre los grupos (ACY vs. PLC) por medio del test de Student. La aparición de ovulación y gestación se analizaron entre los mismos grupos por Chi Cuadrado. El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico Sigma Stat (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) y el nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$.

Resultados

Los servicios se confirmaron en 23 de 24 ciclos estrales estudiados por la visualización o por presencia de espermatozoides en los frotis vaginales, excepto en un ciclo ACY tratado (1/17), en el cual la hembra no pudo ser alojada con el macho por razones ajenas al estudio.

El estro finalizó $7\pm 1,3$ y $7\pm 1,7$ ($P > 0.1$) días después del tratamiento en los ciclos ACY ($n=16$) y PLC ($n=7$), respectivamente. En uno de los ciclos ACY tratados la terminación del estro se detectó 4 meses más tarde. Este ciclo se consideró atípico y fue excluido de la media general. La ovulación ocurrió en 2/17 (11,8%) y 7/7 (100 %) del grupo ACY y PLC respectivamente ($p < 0,05$).

Todas las hembras (7/7) del grupo PLC comenzaron la gestación, mientras una sola del grupo ACY gestó, 1/16 (6.3%; $P < 0,05$). La gestación, el parto y los neonatos fueron normales en todos los casos. El intervalo entre el tratamiento y el primer celo pos tratamiento fue de $18,4\pm 1,7$ para los 14 ciclos anovulatorios; (se excluyeron los dos ciclos ovulatorios ACY), y $120\pm 17,2$ días para los ciclos gestantes ACY y PLC respectivamente. El intervalo interestro post tratamiento del grupo ACY se mantuvo en el rango de los controles históricos de la colonia (10). El intervalo entre el tratamiento y el primer celo en las gatas del grupo ACY que presentaron un interestro ovulatorio no gestante (pseudogestación) fue de 65 días. Cinco hembras que pudieron ser objeto de seguimiento después del estudio tuvieron ciclos estrales normales.

Discusión

Todas las hembras pertenecientes al grupo ACY presentaron signos de celo después del tratamiento y aceptaron al macho. La duración del estro se presentó dentro de los rangos normales para la especie y no hubo diferencias entre ambos grupos (7). Estos resultados están en línea con un trabajo previo en gatos donde el antagonista de GnRH, antide, no suprimió el incremento de los estrógenos durante la fase folicular (1).

Las respuestas a acyline no fueron completamente homogéneas en todos los ciclos. Así, la ovulación y la gestación se impidieron en aproximadamente el 88% (15/17) y 94% (15/16), respectivamente de las gatas servidas. La prevención de la ovulación después del tratamiento con antagonistas de GnRH, ya se ha descrito en los carnívoros domésticos (1,5,6) se debe al bloqueo del pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH). En los dos ciclos ovulatorios tratados del grupo acyline, tal vez el pico de LH habría ocurrido antes de aplicar el tratamiento, y como ha sido reportado anteriormente (6) el tratamiento con el antagonista de la GnRH no produjo regresión del cuerpo lúteo existente.

El intervalo interestro de los ciclos tratados con el antagonista, no difirió de lo que se ha descrito para los ciclos no ovulatorios en esta especie (7), corroborando que los antagonistas no afectan la fase folicular.

Cabe señalar también que, el retorno al celo luego de los tratamientos con el antagonista fue notoriamente sincronizado. Considerando que estas características se han observado en perros y gatos, (1,5,6) los antagonistas de GnRH, pueden ofrecer un modelo para la sincronización de celo en estas especies. En conclusión, en la gata doméstica, el acyline previene la ovulación

aunque el desarrollo folicular temprano (proestro) no parece ser afectado por la privación de gonadotropinas que provoca el tratamiento.

REFERENCIAS

1. Pelican KM, Brown JL, Wildt DE, Ottinger MA, Howard JG. Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. *Gen Comp Endocrinol* 2005;144:110-21.
2. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PN. Prevention and termination of feline pregnancy. En *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: BW Saunders, 2001; pp. 447-52.
3. Romagnoli S, Concannon PW. Clinical use of progestins in bitches and queens: A Review. En: *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Concannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C (Eds.) International Veterinary Information Service (www.ivis.org) 2003; A1206.0903.
4. Wanke MM, Romagnoli S, Verstegen J, Concannon PW. Pharmacological approaches to pregnancy termination in dogs and cats including the use of prostaglandins, dopamine agonists, and dexamethasone. En: *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Concannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C (Eds.) International Veterinary Information Service (www.ivis.org) 2003; A1223.0802.
5. Valiente C, Romero G G, Corrada Y, de la Sota PE, Hermo G, Gobello C. Interruption of the canine estrous cycle with a low and a high dose of the GnRH antagonist, acyline. *Theriogenology* 2009;71(3):408-11.

6. Pelican KM, Wildt DE, Ottinger MA, Howard J. Priming with progestin, but not GnRH antagonist, induces a consistent endocrine response to exogenous gonadotropins in induced and spontaneously ovulating cats. *Domest Anim Endocrinol.* 2008;34:160-75.
7. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PN. The feline estrous cycle. En *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: BW Saunders, 2001; pp. 396-405.
8. Corrada Y, Gobello C. Reproducción en el gato doméstico. En: Bosch, R. *Actualización en Reproducción Animal* (2da ed) UNRC, Argentina. 2005; Pp: 319-33.
9. Mattoon J, Nyland T. Ultrasonography of the genital system. En: Nyland T, Mattoon J (Eds), *Veterinary Diagnostic Ultrasound*. W. B. Philadelphia: BW Saunders, 1995; pp. 141-64.
10. Risso A, de la Sota PE, Abeya M, García, Sirini M, Corrada Y, Blanco PG, Valiente C, García Romero G, Martínez N, Gobello C. Colonia experimental felina del Laboratorio de Fisiología Reproductiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. X Congreso Nacional AVEACA, 2010; p 122.

CAPITULO II

EFEECTO DEL ANTAGONISTA DE GnRH, ACYLINE

EN LA GESTACIÓN

Introducción

Los antagonistas de GnRH son particularmente útiles cuando se requiere un efecto inhibitorio rápido del eje gonadal. En hembras felinas, una de las situaciones en que se requiere una rápida intervención es la interrupción de la gestación no deseada, situación para la cual aún no ha sido desarrollada ninguna droga que sea segura, eficaz y de dosis única (1).

Recientemente se han descrito los efectos de la tercera generación de antagonistas de GnRH como el acyline en distintas especies. Una dosis de acyline interrumpió la gestación en hembras caninas sin efectos secundarios (2). En felinos no hay datos acerca del efecto de los antagonistas de GnRH durante la gestación felina.

Si bien, la prolactina ha demostrado ser luteotrófica en la gestación media y tardía de los felinos (3,4), la función exacta de la hormona luteinizante (LH) en el cuerpo lúteo de gestación no ha sido descrita en esta especie.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente estudio fue probar el efecto del antagonista acyline sobre las concentraciones séricas de P_4 y en las distintas etapas de la gestación felina.

Materiales y Métodos

Animales

El estudio incluyó 14 hembras felinas mestizas, en buen estado de salud, alojadas bajo las mismas condiciones que en el experimento anterior. Las gatas presentaban una preñez de ≤ 25 a > 45 días desde el primer servicio. La gestación se confirmó por examen ultrasonográfico (Toshiba Core Vision Pro; Toshiba, Otawara-Shi, Tochigi-Ken, Japan (5)).

Diseño experimental y protocolos farmacológicos

De acuerdo a su fecha de apareamiento las gatas se distribuyeron aleatoriamente en uno de los siguientes protocolos farmacológicos:

- GRUPO ACYLINE [ACY (n =10)]: se administró acyline (Contraception & Reproductive Health Branch Center for Population Research, NIH, Bethesda, MD, USA) 330 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía subcutánea (sc).
 - Temprano: \leq día 25 post servicio (ACY-E; n =3).
 - Medio: día 26 a 45 post servicio (ACY-M; n =4).
 - Tardío: $>$ día 45 post servicio (ACY-L; n =3).

- GRUPO PLACEBO [PLC (n=4)] se administró el correspondiente volumen de solución fisiológica por vía sc.

Las hembras placebo se asignaron aleatoriamente a los tratamientos: Temprano (n=1), Medio (n=2) y Tardío (n= 1) usando los mismos periodos gestacionales.

La formulación, preparación y dosis del acyline coinciden con las explicadas en el capítulo I. La dosis usada se basó en estudios clínicos hechos en perras (6) y en estudios pilotos en hembras felinas.

Seguimiento clínico

Todas las gatas se evaluaron diariamente luego del tratamiento. La observación incluyó cambios de comportamiento (conducta de parto), descarga vulvar, visualización de aborto y efectos colaterales locales y sistémicos. La sospecha clínica de interrupción de la preñez se definió como la aparición de descarga vulvar y/o la expulsión de uno o más fetos.

Extracciones de sangre y determinaciones hormonales

Se colectaron muestras de sangre por venopunción periférica para la determinación de P₄ sérica el día anterior al tratamiento y los días 7 y 14 luego del mismo para describir, indirectamente, los efectos del antagonista sobre el cuerpo lúteo. La P₄ sérica se determinó por duplicado con un RIA

de fase sólida (Coat-A-Count, DPC®, Los Angeles, USA). Para este kit, la sensibilidad al 95% de unión fue de 0,1 ng/ml, y el CV intra-ensayo fue de 5,6 %. Todas las muestras de cada animal se determinaron con el mismo ensayo, de esta manera se redujeron los efectos de la variación entre los mismos.

Examen ultrasonográfico

Luego del tratamiento se llevó a cabo el monitoreo ultrasonográfico (Toshiba Core Vision Pro, Japan, 8-MHz linear-array transducer) de la gestación cada 2 días y durante 14 días, observando los signos de aborto o resorción (5).

La evaluación ecográfica incluyó el diámetro de los sacos gestacionales, los latidos cardíacos fetales, la anatomía de los fetos y la adhesión de la placenta. La reabsorción fue definida como la muerte de todos los embriones, disminución del volumen de la ampolla fetal y homogeneización de las estructuras embrionarias o fetales. Se consideró aborto cuando se visualizó vacuidad uterina (7).

Análisis estadístico

La interrupción de la gestación se comparó entre grupos tratados (ACY vs. PLC) mediante Chi Cuadrado. Las concentraciones séricas de P_4 se analizaron por ANOVA de medidas repetidas. El

análisis estadístico se realizó con Sigma Stat (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) y el nivel de significancia se estableció como $p < 0,05$.

Resultados

Todas las hembras (14/14) mantuvieron la gestación durante el periodo de estudio. La gestación progresó normalmente, como así lo demostraron la ausencia de signos clínicos, el mantenimiento de las concentraciones séricas de P_4 (Fig. 1) y la normalidad de los hallazgos ultrasonográficos realizados. Ninguna de las gatas presentó efectos colaterales locales o sistémicos relacionados con los tratamientos. Seis gatas que fueron objeto de seguimiento después del estudio parieron normalmente cachorros sanos a término.

Las ocho restantes fueron histerectomizadas después de la prueba y la inspección uterina reveló fetos y placentas normales. Las concentraciones séricas de P_4 no difirieron entre cada uno de los subgrupos de tratamiento (temprano, medio y tardío) durante todo el experimento ($P > 0,1$). En todos los casos, los valores individuales de P_4 se mantuvieron dentro de los descriptos para la gestación felina normal (8).

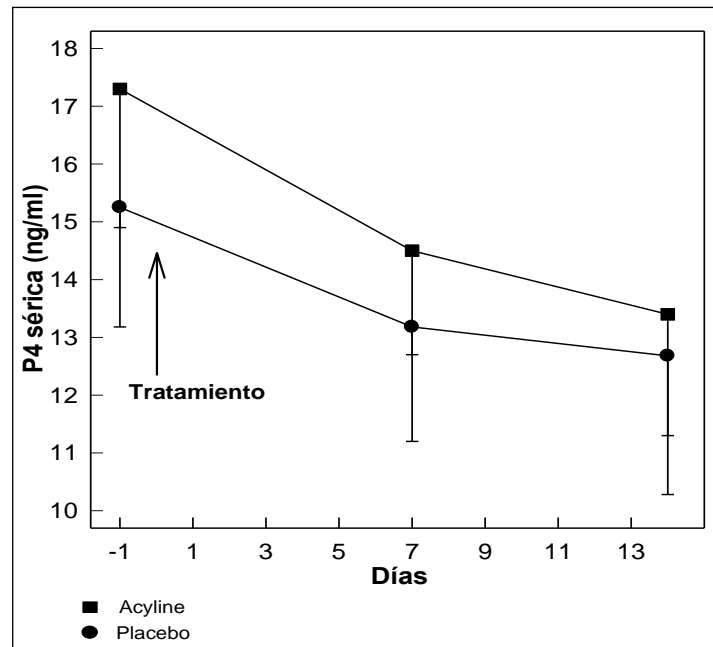


Figura 1. Concentraciones séricas de progesterona (media \pm SEM) de gatas tratadas con acyline (330 μ g/kg; n=10) y placebo (n=4) ($P > 0,01$)

Discusión

Es ampliamente aceptado que la P_4 del ovario es fundamentalmente necesaria para el mantenimiento de la gestación y que en los felinos la P_4 placentaria podría tener un papel menor en el último tercio (9,10). También se conoce que el cuerpo lúteo ovárico tiene una etapa inicial independiente (11) y una segunda (segundo tercio de gestación) en el que es claramente dependiente de hormonas luteotróficas. Sin embargo, resta definir en la especie cuales son exactamente las hormonas luteotróficas.

Como se apreció en los resultados, las concentraciones de P_4 permanecieron constantes, permitiendo afirmar que, el tratamiento con acyline no induciría luteólisis en ninguna etapa de la

gestación. Este hallazgo contribuye, indirectamente, a aclarar el papel de la LH en el mantenimiento de la gestación felina. De acuerdo con los resultados actuales, y de manera diferente a los caninos (2), la LH en los felinos no parece ser necesaria para el mantenimiento del cuerpo lúteo en las distintas etapas de la gestación. Coincidentemente, una situación similar se describió en la pseudogestación felina (12). Por lo tanto, la prolactina aparece como hormona luteotrófica principal en esta especie.

En línea con reportes recientes utilizando antagonistas de tercera generación en perras (2) no se presentaron efectos colaterales locales ni sistémicos, asociados al acyline. Se concluye que, en la gata doméstica, el antagonista de la GnRH, acyline, no afecta el cuerpo lúteo gestacional por lo que la LH no sería un factor luteotrófico esencial para la especie.

REFERENCIAS

1. Wanke MM, Romagnoli S, Verstegen J, Concannon PW. Pharmacological approaches to pregnancy termination in dogs and cats including the use of prostaglandins, dopamine agonists, and dexamethasone. En: Recent Advances in Small Animal Reproduction. Concannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C (Eds.) International Veterinary Information Service (www.ivis.org) 2003; A1223.0802.
2. Valiente C, Corrada Y, de la Sota PE, Blanco P, Arias D, Gobello C. Comparison of two

- doses of the GnRH antagonist, acyline, for pregnancy termination in bitches. *Reprod Dom Anim.* 2009 (Suppl 2);44:156-9.
3. Erüinal-Maral N, Aslan S, Findik M, Yüksel N, Handler J, Arbeiter K. Induction of abortion in queens by administration of cabergoline (Galastop) solely or in combination with the PGF2alpha analogue Alfaprostol (Gabbrostim). *Theriogenology* 2004; 61:1471-5.
 4. Verstegen JP, Onclin K, Silva LD, Donnay I. Abortion induction in the cat using prostaglandin F2 alpha and a new anti-prolactinic agent, cabergoline. *J Reprod Fertil (Suppl)* 1993; 47:411-7.
 5. Mattoon J, Nyland T. Ultrasonography of the genital system. En Nyland T, Mattoon J (Eds), *Veterinary Diagnostic Ultrasound*. W. B. Philadelphia: BW Saunders, 1995; pp. 141-64.
 6. Valiente C, Romero GG, Corrada Y, de la Sota PE, Herno G, Gobello C. Interruption of the canine estrous cycle with a low and a high dose of the GnRH antagonist, acyline. *Theriogenology* 2009;71(3):408-11.
 7. England GCW, Russo M. Ultrasonographic characteristics of early pregnancy failure in bitches. *Theriogenology* 2006;66:1694–8.
 8. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PN. The feline estrous cycle. En *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: BW Saunders, 2001; pp. 396-405.
 9. Goodrowe KL, Howard JG, Schmidt PM, Wildt DE. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. *J Reprod Fertil (Suppl)* 1989;39:73–90.

10. Tsutsui T, Suzuki Y, Toyonaga M, Oba H, Mizutani T, Hori T. The role of the ovary for the maintenance of pregnancy in cats. *Reprod Dom Anim (Suppl 2)* 2009; 44:120-4.
11. Wildt DE, Panko WB, Seager SW. Effect of prostaglandin F2 alpha on endocrine-ovarian function in the domestic cat. *Prostaglandins* 1979;18:883-92.
12. Pelican KM, Wildt DE, Ottinger MA, Howard J. Priming with progestin, but not GnRH antagonist, induces a consistent endocrine response to exogenous gonadotropins in induced and spontaneously ovulating cats. *Domest Anim Endocrinol.* 2008;34:160-75.

CAPITULO III

POSTERGACIÓN DE LA PUBERTAD CON EL AGONISTA DE GNRH, DESLORELINA

Introducción

La administración continua de agonistas de GnRH actúa a través de la desensibilización y regulación negativa de los receptores de GnRH en la hipófisis, inhibiendo la función ovárica. Sin embargo, este efecto es inicialmente precedido por un aumento de la liberación de gonadotrofinas que, en las hembras pospúberes, puede dar lugar a una respuesta estral indeseable. Así, el momento de administración de los agonistas parece ser crucial para prevenir este efecto secundario. En la gata doméstica, la pubertad se alcanza con el 75% del peso adulto (1, 2).

Los agonistas de GnRH de liberación lenta han demostrado posponer la pubertad en humanos (3) y perros (4,5) aunque sus efectos sobre la pubertad felina y las gónadas inmaduras no han sido descritos aún. En ratas prepúberes, la supresión de gonadotrofinas con análogos de GnRH disminuyó el peso de los ovarios y el número de folículos antrales (6, 7).

Para testear la hipótesis de que, en la hembra felina el agonista de GnRH de liberación prolongada, acetato de deslorelina, administrado con el 50% del peso corporal adulto pospone la pubertad, sin la estimulación inicial del eje gonadal, el objetivo de este estudio fue probar la eficacia y seguridad de los implantes sc de liberación lenta, de acetato de deslorelina, para

postergar la pubertad, en la gata doméstica. Secundariamente, describir los efectos del agonista sobre el ovario.

Materiales y Métodos

Animales

Se incluyeron en este estudio un total de 30 hembras felinas, mestizas prepúberes, de 90 a 180 días de edad, en buen estado de salud, y que poseían aproximadamente el 50% del peso adulto (1,300 a 1,600 kg). Cinco de ellas (17%) eran hermanas de camada. Los animales se alojaron en gateras individuales, se alimentaron con alimento balanceado comercial y agua *ad libitum*. Desde el nacimiento fueron expuestas a 10-14 hs de luz diaria. La totalidad del estudio tomó 18 meses.

Diseño experimental y protocolo farmacológico

Las gatas se distribuyeron aleatoriamente a uno de los siguientes protocolos farmacológicos:

- GRUPO DESLORELINA [DSL (n =15)]: se administró acetato de deslorelina 5 mg (Suprelorin, Virbac, France) sc.
- GRUPO PLACEBO [PLA (n=15)]: se administró implante sc de excipiente.

La deslorelina fue provista en forma de implantes subcutáneos de 0.23 x 15.2 mm biocompatibles cargados en jeringas descartables.

Seguimiento

El seguimiento se realizó diariamente desde el comienzo del tratamiento y hasta la pubertad o la edad de 18 meses. El mismo incluyó el examen físico, la observación del comportamiento sexual ($\geq 1,5$ hora/día) y la eventual aparición de efectos colaterales locales y/o sistémicos relacionados al tratamiento. Adicionalmente, los animales se pesaron semanalmente.

Citología vaginal

La citología vaginal se realizó tres veces por semana y se interpretó de acuerdo a Mills (1979; 8) durante todo el período en estudio. La pubertad se diagnosticó por la manifestación del comportamiento típico de celo en presencia de un macho y la aparición de ≥ 80 % de células escamosas superficiales en los frotis vaginales (8,9). La respuesta estral pos implante se definió cuando estos signos aparecieron dentro de las 2 semanas de colocado el implante (10).

Ovariectomía

Cinco a 15 días después de alcanzada la pubertad (n=28) o, a la edad de 18 meses (n=1), se realizó la ovariectomía con la técnica descrita por Janssens y Janssens (1991; 11). La anestesia general se realizó con xylazina (1-3 mg/kg im; Kensol, Köing, Argentina) y ketamina (15-25 mg/kg im; Ketmin-50, Holliday, Argentina), y se complementó con anestesia local usando lidocaína 1% (máximo 0,5 ml). Luego de la cirugía se inyectó ketoprofeno sc (Ketofen, Fort Dodge, Argentina; 1 mg/kg) y se continuó con administración oral cada 24 horas durante 4 días. Una hembra del grupo deslorelina no pudo ser ovariectomizada por motivos ajenos al estudio.

Examen macroscópico de los ovarios

Ambos ovarios, derecho e izquierdo, se colectaron durante la cirugía y se clasificaron macroscópicamente según la presencia o ausencia de folículos y cuerpos lúteos en estadio: inactivo (ausencia de folículos ≥ 2 mm de diámetro), o activo (presencia de un folículo maduro de ≥ 2 mm de diámetro y uno o más cuerpos lúteos presentes en uno o ambos ovarios) (12).

Evaluación histológica de los ovarios

Los ovarios se fijaron en líquido Bouin durante 12 horas, se colocaron en alcohol 70 y luego se procesaron, embebidos con parafina, con la técnica de rutina. Se realizaron cortes seriados de 5 μ

cada uno, desparafinaron con xilol, rehidrataron con soluciones de alcoholes decrecientes, se montaron sobre portaobjetos y finalmente se tiñeron con hematoxilina-eosina (13)

1. Los folículos se clasificaron de acuerdo al sistema propuesto por Gould and Woodruff (2006; 14) en: primordiales (presencia de un ovocito pequeño rodeado de una capa simple de células epiteliales planas o cúbicas); primarios (presencia de un ovocito mas grande, rodeado de una capa simple de células cilíndricas); secundarios (presencia de un ovocito en el cual las células de la granulosa formaban dos o más capas y las de la teca una capa de células); antrales (presencia de un ovocito con licor folicular, cúmulus, células de la granulosa y dos o más capas de células tecales) y atrésicos.

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva (media±SEM). La edad (días) y peso (kg) al momento de la pubertad se compararon entre los grupos por test de Student. La seguridad se analizó con el test de Fisher. El nivel de significancia se estableció como $p < 0.05$ (SPSS 17.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

Resultados

La edad a la pubertad varió de 180 a 428 días, y de 134 a 286 días para los grupos deslorelina y control respectivamente. La edad a la pubertad (281.2 ± 21.6 vs. 177.8 ± 10.8 ; $P < 0.01$) pero no el peso (2.6 ± 0.1 vs. 2.5 ± 0.1 ; $P > 0.1$) ni la seguridad ($P > 0.1$) difirieron entre los mismos grupos.

Una gata del grupo deslorelina no alcanzó la pubertad durante el periodo de estudio, este caso fue considerado un “outlier” y excluido del análisis estadístico. Otra gata del mismo grupo presentó respuesta estral pos implante a los 13 días, y una tercera (la gata no ovariectomizada) tuvo piómetra a los 92 días posteriores a la implantación. El resto de los animales no presentó efectos colaterales.

El examen macroscópico de las gónadas reveló que, todas las gatas del grupo deslorelina presentaron ovarios pequeños, inactivos, mientras que las del grupo placebo mostraron algún folículo o cuerpo lúteo en alguna de las gónadas. La hembra que no alcanzó la pubertad se ovariectomizó a los 18 meses y presentó ovarios particularmente pequeños y fibrosos.

La observación histológica de los ovarios reveló, en las hembras tratadas con el agonista, una corteza delgada con folículos exclusivamente primordiales, primarios y secundarios, y reducción del número de folículos antrales. En tanto, en las gatas placebo se observó presencia de todos los estadios de folículos (Figura 1).

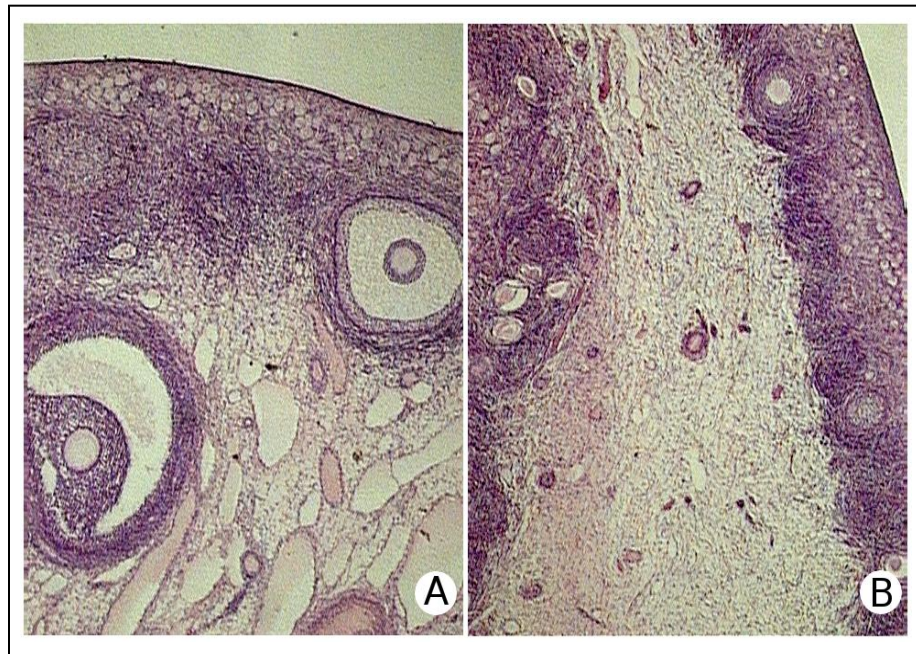


Figura 1: Corte histológico de tejido ovárico de gatas al momento de la pubertad (40x H&E). La foto A muestra la corteza de un ovario del grupo placebo con un folículo antral grande. En la foto B se observa la estrechez de la corteza y la presencia de folículos primordiales, primarios y secundarios, de un ovario del grupo tratado con implantes de deslorelina.

Discusión

Los agonistas de GnRH de larga duración mostraron ser efectivos contraceptivos por periodos que exceden el año en gatas pospúberes (15,16). En estas hembras felinas prepúberes, a diferencia de lo que ocurre en la hembra madura, la postergación de la pubertad obtenida, fue en

general, más corta. Estas diferencias pueden atribuirse a la dosis (4.7 vs. 6 mg) o al agonista (deslorelina vs. azagly-nafarelina) usado en los distintos estudios, como así también a la madurez reproductiva de los animales experimentales.

En este estudio, hubo además un amplio rango (aproximadamente 250 días) de tiempo en el que los animales tratados alcanzaron la pubertad, e incluso una gata que no la alcanzó durante el periodo de seguimiento. Esta variabilidad de los efectos de los agonistas de GnRH fue descrita anteriormente en perros y gatos (10,15). Resultados similares se encontraron en yeguas, donde la susceptibilidad individual a una sola aplicación de deslorelina causó la completa involución del ovario en solo algunos de los animales tratados (17).

El crecimiento del animal no resultó alterado por los tratamientos en ninguna de las hembras, e independientemente del grupo, la pubertad se alcanzó con un peso corporal normal. Estos resultados se hallan en línea con un estudio realizado en monos jóvenes con depleción farmacológica de gonadotrofinas, donde registros secuenciales del peso corporal corroboraron que el tratamiento no afectó el crecimiento (18).

La ausencia de respuesta estral pos implante obtenida puede reflejar en la mayoría (93%) de las gatas tratadas la inmadurez de los ovarios y/ o del eje hipotálamo- hipófisis al momento de la implantación (aproximadamente 50% del peso adulto). De manera similar, perras beagles prepúberes no presentaron respuesta estral pos tratamiento con agonistas de GnRH cuando se medicaron a los 4 meses de edad con aproximadamente el 50% del peso adulto (4). Estos resultados parecen indicar que debería ser evitado el período peripuberal cuando se usan formulaciones de depósito de agonistas de GnRH en las hembras felinas. La aparición de respuesta estral en solo una gata del estudio podría explicarse por la variabilidad individual de respuesta a los agonistas de GnRH.

La aparición de piómetra luego de 3 meses de implantación con deslorelina fue previamente reportada en perras adultas (5) aunque en los felinos es el primer reporte. Cabe señalar que, en el presente estudio, la única gata que no pudo ser ovariectomizada desarrolló piómetra, con lo cual la ovariectomía del resto de animales pudo haber disminuido la incidencia real de este efecto colateral a largo plazo.

En línea con hallazgos en modelos murinos (6,7), todas las gatas del grupo deslorelina presentaron ovarios inactivos con ausencia o disminución de folículos dependientes de gonadotrofinas, indicando indirectamente, la deprivación hormonal. En futuros estudios, sería interesante probar la fertilidad en las hembras tratadas.

Se concluye que, la administración de un agonista de GnRH de liberación prolongada, en gatas con el 50% del peso corporal adulto, postpone la pubertad (aproximadamente 100 días) y disminuye el desarrollo de folículos antrales, sin alterar el crecimiento. Por otro lado, aunque la aparición de efectos colaterales es baja, debe considerarse al usar estos implantes.

REFERENCIAS

1. Stamou A, Boscos C. The estrous cycle of the domestic cat. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 2001; (1): 339-46.
2. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS. The feline estrous cycle. En: *Canine and Feline Theriogenology*. Saunders, WB. Philadelphia. 2001a; 396-40.

3. Bertelloni S, Mul D. Treatment of central precocious puberty by GnRH analogs: long-term outcome in men. *Asian J Androl* 2008; 10(4):525-34.
4. Rubion S, Desmoulins PO, Riviere-Godet E, Kinziger M, Salavert F, Rutten F, Flochlay-Sigognault A, Driancourt MA. Treatment with a subcutaneous GnRH agonist containing controlled release device reversibly prevents puberty in bitches. *Theriogenology* 2006; 66:1651-4.
5. Corrada Y, Hermo G, Johnson CA, Trigg TE, Gobello C. Short-term progestin treatments prevent estrous induction by a GnRH agonist implant in anestrous bitches. *Theriogenology* 2006; 65(2):366-73.
6. van den Dungen HM, van Dielen JA, Tilders FJ, van Rees JP, Schoemaker J. Administration of a GnRH-antagonist to immature rats affects subsequent female and male pubertal development differently. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989; 120(6): 778-84.
7. Muir TW, Leach RE, Roche PC, Gaffey TA, Kuehl TJ, Dukelow WR, Ory SJ. GnRH Antagonist Effects on Follicle Number and Size in Rat Neonates and Infants. *Zoolog Sci* 1999; 16(2):299-302.
8. Mills JN, Valli VE, Lumsden JH. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *Can Vet J* 1979; 20:95-101.
9. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PN. The feline estrous cycle. In *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: BW Saunders., 2001, pp. 396-405.
10. Gobello C. New GnRH analogs in canine reproduction: A review. *Anim Reprod Sci* 2007; 100:1-13.
11. Janssens LAA, Janssens GHRR. Bilateral flank ovariectomy in the dog: surgical technique and sequelae in 72 animals. *J Small Anim Pract* 1991; 32:249-52.

12. Karja NW, Otoi T, Murakami M, Fahrudin M, Suzuki T. In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology*. 2002; 57(9):2289-98.
13. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques* 3th edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York., 1990, pp. 34.
14. Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* 2006; 66:5-13.
15. Munson L, Bauman JE, Asa CS, Jochle W, Trigg TE. Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrus in cats. *Journal of Reprod. Fertil* 2001; 57: 269-73.
16. Rubion S, Driancourt MA. Controlled delivery of a GnRH agonist by a silastic implant (Gonazon) results in long-term contraception in queens. *Reprod Domest Anim* 2009; 44 (2):79-82.
17. Johnson CA, Thompson DL Jr, Kulinski KM, Guitreau AM. Prolonged interovulatory interval and hormonal changes in mares following the use of Ovuplant to hasten ovulation. *J Equine Vet Sci* 2000; 20:331-6.
18. Lunn SF, Recio R, Morris K, Fraser HM. Blockade of the neonatal rise in testosterone by a gonadotrophin-releasing hormone antagonist: effects on timing of puberty and sexual behaviour in the male marmoset monkey. *J Endocrinol* 1994; 141(3):439-47.

CAPITULO IV

**VALIDACIÓN BIOLÓGICA DEL ESTRADIOL Y PROGESTÁGENOS
FECAL EN EL GATO DOMÉSTICO (*FELIS CATUS*)**

Introducción

Los métodos convencionales para obtener datos de la endocrinología de los animales domésticos requieren análisis de muestras sanguíneas seriadas. La venopunción periférica es una maniobra invasiva que resulta impracticable en animales susceptibles al estrés como los felinos. Por ello, los gatos requieren normalmente anestesia general para este procedimiento. Los métodos no invasivos como la medición de metabolitos hormonales excretados en orina o heces no requieren manipuleo de los animales y evidencian concentraciones hormonales promedio, apareciendo como alternativas atractivas (1).

Para muchas especies, la decisión de medir hormonas en materia fecal o en orina lo determina el hecho de que el material sea fácil de recoger, procesar y analizar. Sin embargo, el modo de excreción también debe considerarse. En el caso de los felinos el análisis urinario de esteroides reproductivos no es una opción viable, ya que los esteroides se excretan casi exclusivamente en las heces (1,2). Además muchas especies felinas, incluida la doméstica, eliminan la orina en forma de spray o gotitas por lo que la recolección resulta imposible. Estudios del metabolismo en el gato doméstico han demostrado que el 85–95% de los metabolitos son excretados en heces (1,2).

La inyección de esteroides radioactivos en el gato doméstico reveló que el estradiol es eliminado en cantidades iguales como estradiol no conjugado y conjugados de estrógeno no enzimáticos hidrolizables (3-sulfato, 17 α -sulfato y 17 β sulfato). La P₄ es metabolizada y excretada como metabolitos polarizados, posiblemente conjugados enzimáticos no hidrolizables (>75%), y pregnanos no conjugados (1,2). Además, los metabolitos de esteroides sexuales pueden ser medidos en orina y heces con un retraso de 4 a 24 hs con respecto a los que se encuentran en circulación (3).

La determinación de metabolitos hormonales en materia fecal requiere, como paso previo, el proceso de extracción. Mediante este método, los componentes de interés en las muestras son aislados, removidos o concentrados, evitando la interferencia de otras partículas (4).

Se han descrito varias técnicas, con diferente número de pasos y de complejidad, para la extracción de esteroides sexuales en materia fecal (1, 5, 6). El método “simple” de extracción de esteroides (3), se vislumbra como una técnica muy útil, que hasta donde conocemos, no ha sido validada biológicamente en el gato doméstico.

El objetivo de este trabajo fue validar biológicamente la técnica “simple” de extracción (utilizada en nuestro Laboratorio) para estradiol y progestágenos fecales en el gato doméstico. Para este propósito los valores de estradiol y progestágenos fecales se compararon durante las distintas etapas del ciclo estral. Adicionalmente, los valores de progesterona sérica y progestágenos fecales se correlacionaron en algunas muestras.

Materiales y Métodos

Animales y diseño experimental

Durante 12 meses de estudio se utilizaron un total de 14 hembras felinas pospúberes, fértiles, entre 2 y 4 años de edad pertenecientes a la colonia experimental del Laboratorio de Nutrición Mineral y Fisiología Reproductiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Las gatas se alojaron en gateras individuales, de acuerdo a las normas internacionales del Cuidado de Animales de Laboratorio, expuestas a fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad y alimentadas con balanceado comercial y agua *ad libitum*. Un gato macho entero, alojado en similares condiciones, se usó para los servicios y para la observación del comportamiento de las hembras.

Seguimiento comportamental y estudio citológico

Las hembras se examinaron físicamente en forma diaria (>1 hora 2 veces al día) y comportamentalmente en presencia del macho. El estro se corroboró por los hallazgos de comportamiento y citológicos típicos (7) mientras los periodos de interestro se definieron como el intervalo entre dos estros. Los interestros mayores a 21 días fueron considerados como ovulatorios.

Diagnóstico de gestación

En cinco gatas a las que se les dio servicios con el macho, se confirmó la gestación por ultrasonografía (Toshiba Core Vision Pro, Japan, transductor lineal de 8-MHz) a los 21 días luego de los mismos (8).

Muestreo fecal

Un total de 100 muestras se recolectaron de manera seriada en la etapa de estro (n=43), interestro (n=51) y gestación media (n=6). Se seleccionaron heces frescas y libres de elementos ajenos a la muestra. Las muestras fueron conservadas en frascos rotulados a -20°C hasta su procesamiento.

Muestreo sanguíneo

De 12 a 24 horas antes del muestreo fecal, se tomaron muestras de sangre únicas por venopunción periférica y bajo anestesia general (descrita en el capítulo III), en las etapas de interestro (n= 10), estro (n= 1) y gestación (n= 1). Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 3000 rpm, y el suero obtenido fue almacenado a -70°C hasta su procesamiento.

Extracción húmeda de metabolitos fecales

El método de extracción de metabolitos de las hormonas esteroideas utilizado es el descrito como “método simple” por Brown y col, 2008 (3) con algunas modificaciones. Brevemente, la totalidad de las muestras de heces se pesaron y homogeneizaron. Luego se tomó una alícuota de 250 mg, reservando el resto de la muestra para el caso que fuera necesario efectuar otras mediciones. A la alícuota se le agregaron 5 ml de alcohol etílico absoluto, se agitó primero a mano y luego por vórtex durante 1 minuto. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se separó el sobrenadante, del cual se extrajeron 200 μ l que se colocaron en un tubo de ensayo para dejarlo evaporar durante 24 a 48 hs hasta su sequedad. Se resuspendió el residuo seco en 200 μ l de buffer de esteroides para la medición de metabolitos fecales. Los resultados se expresaron en valores de peso húmedo.

Determinaciones hormonales

La P_4 sérica, los progestágenos, y los estrógenos fecales fueron determinados en duplicado con un (RIA) de fase sólida (Coat-A-Count, DPC®, Los Angeles, USA). Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron menores al 10%. De acuerdo a los valores séricos de P_4 los periodos interestros se clasificaron en ovulatorios ($> 2\text{ng/ml}$) y no ovulatorios ($< 2\text{ng/ml}$). Los resultados obtenidos en el ensayo en ng/ml para progestágenos fecales y en pg/ml para estradiol fecal se transformaron y expresaron en ng/g y pg/g de materia fecal húmeda, respectivamente.

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva (media \pm SEM) de los valores fecales de β estradiol y progestágenos obtenidos. Las diferencias entre las concentraciones de progestágenos en las muestras fecales tomadas en fase folicular vs. en fase lútea (preñadas y vacías), ciclos ovulatorios vs. no ovulatorios, y ovulatorios vs. gestantes se compararon mediante el test de Student. El mismo test también se utilizó para comparar los valores de estradiol de las muestras tomadas en estro y en interestro. Además, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre los valores de progestágenos en materia fecal y P₄ en suero. El nivel de significancia se estableció como $p < 0.05$ (Sigma Stat SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Resultados

La concentración de estradiol y progestágenos varió de 926 a 43720 pg/g y de 20 a 778 ng/g de materia fecal húmeda, respectivamente. La media \pm SEM de las concentraciones de estradiol en gatas en estro e interestro fueron de 17107 \pm 1,8 vs. 4500 \pm 396 pg/g ($p < 0,01$; Figura 1: A, B, C, D, E, F). Para los progestágenos fecales (Tabla 1) se encontraron diferencias entre los valores obtenidos en fase folicular vs. fase lútea (106 \pm 22,5 vs. 404 \pm 57; $p < 0,05$), ciclos ovulatorios vs. no ovulatorios (425,16 \pm 90,3 vs. 159,7 \pm 39,8; $p = 0,01$) pero no entre los ovulatorios vs. gestantes (425,16 \pm 90,2 vs. 384,3 \pm 80,2; $p > 0,1$). El coeficiente de correlación de Pearson entre los valores hallados en materia fecal y en suero fue de 0,77 ($p < 0,01$).

	Fase folicular	Fase lútea		
		No-ovulatoria	Ovulatoria	Gestante
Progestágenos (ng/g)	106 ± 22,5	159,72	425,16	384,3
(n = 23)		±39,8	±90,24	±80,23

Tabla 1: Concentraciones (media ± SEM) de progestágenos fecales (ng/g) durante las fases folicular y lútea de trece gatas domésticas.

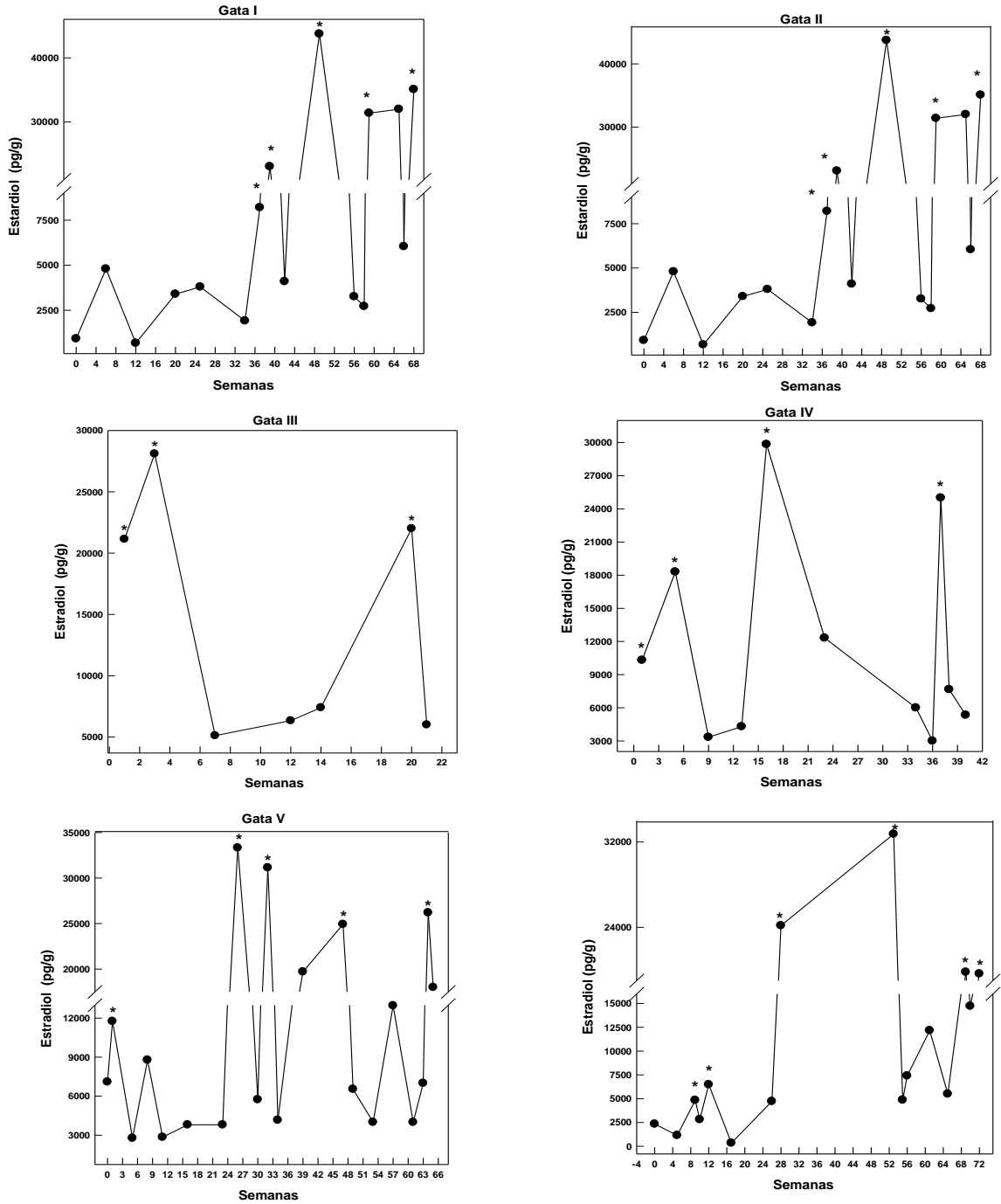


Figura 1: Concentraciones de β estradiol en materia fecal de una sección del muestreo longitudinal en distintos momentos del ciclo estral de 6 gatas (A, B, C, D, E, F) de la colonia experimental. Los asteriscos indican celo citológico y comportamental.

Discusión

Si bien los valores absolutos de β estradiol y progestágenos en materia fecal aquí obtenidos resultaron menores a los reportados en la bibliografía (9) es importante considerar que las diferencias pueden deberse al método de extracción y a la muestra fecal usada por cada laboratorio. En este trabajo en particular, el uso de una técnica de extracción en materia fecal húmeda pudo haber contribuido al hallazgo de valores absolutos inferiores que los reportados previamente. En este aspecto, las correlaciones entre muestras pareadas húmedas y secas han sido previamente reportadas para el estradiol y los metabolitos de P_4 (1). Además, el β estradiol aumentó > 3 veces en el estro con respecto al interestro, lo que resulta en un aumento relativo similar al informado previamente para esta hormona (6). También, las diferencias en los valores absolutos de las distintas gatas podrían deberse a una variación individual en la eliminación digestiva del estradiol.

Eventos fisiológicos como la gestación y la citología vaginal o el comportamiento estral, indirectamente indican hiperprogesteronemia e hiperestrogenemia, respectivamente. La correlación de los resultados en materia fecal con las concentraciones de hormona sérica y los eventos fisiológicos garantizan la validación biológica de este sencillo método de extracción. Los valores obtenidos en materia fecal permitieron diferenciar las etapas del ciclo estral felino caracterizadas por estrogenemia (estro) o progesteronemia (gestación o ciclo-ovulatorio) altas de los de estrogenemia (interestro) o progesteronemia basal (ciclo no ovulatorio).

Además, es de esperar que las diferencias aquí halladas sean aún mayores cuando el estro se compare con el anestro profundo estacional en futuros estudios. Por el contrario, lo mismo que ha sido descrito para las concentraciones séricas de P_4 (9), no se han encontrado diferencias en las

concentraciones de progestágenos fecales tomadas en muestras de gestación media y de hembras pseudopreñadas (ciclos ovulatorios). También se encontró una alta correlación entre niveles séricos para la P₄ y progestágenos, respectivamente.

Se concluye que, en la gata doméstica, este “método simple modificado” para la extracción de esteroides sexuales en materia fecal permite diferenciar las distintas etapas del ciclo estral, teniendo una alta correlación con la progesterona sérica y los hallazgos fisiológicos.

Bibliografía

1. Brown JL, Wasser SK, Wildt DE, Graham LH. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured non-invasively in feces. *Biol. Reprod.* 1994; 51:776–86.
2. Brown JL. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. *Theriogenology.* 2006; 66: 25–36.
3. Brown JL, Wakter S, Steinman K. Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non domestic species. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park VA.USA. 2008; Pp. 62.
4. Mills JN, Valli VE, Lumsden JH. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *Can. Vet. J.* 1979; 20: 95–101.
5. Graham LH, Raeside JI, Goodrowe KL, Liptrap RM. Measurements of faecal oestradiol and progesterone in non-pregnant and pregnant domestic and exotic cats. *J. Reprod. Fertil.* 1993; (Suppl) 47: 119-20.

6. Pelican KM, Brown JL, Wildt DE, Ottinger MA, Howard JG. Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2005; 144: 110-21.
7. Mattoon J, Nyland T. Ultrasonography of the genital system. In: Nyland T, Mattoon J (eds.), *Veterinary Diagnostic Ultrasound*. WB Saunders, Philadelphia. pp. 1995; 141-64.
8. Shille MV, Haggerty MA, Shackleton C, Lasley BL. Metabolites of estradiol in serum, bile, intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*. 1990; 34: 779-79
9. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS. The feline estrous cycle. En: *Canine and Feline Theriogenology*. WB Saunders, Philadelphia. 2001; pp. 396-05.

CONCLUSIONES FINALES

- ❖ En la gata doméstica el antagonista de GnRH, acyline, no afecta el desarrollo folicular, sin embargo impide la ovulación, muy probablemente mediante el bloqueo del pico preovulatorio de LH. El retorno al ciclo estral luego de este tratamiento, resulta sincronizado, lo cual convertiría a los antagonistas en herramientas útiles para el desarrollo de técnicas de reproducción asistida en la especie.
- ❖ El el antagonista de GnRH, acyline, no afecta el cuerpo lúteo gestacional de los felinos en ninguna de sus etapas. Este novedoso hallazgo demuestra que la LH no sería un factor luteotrófico esencial para la especie. Por otra parte, esto reivindica el papel de la prolactina en el mantenimiento de la gestación de los gatos.
- ❖ Ninguno de los animales tratados con acyline presentó efectos colaterales locales ni sistémicos clínicos relacionados a los tratamientos.
- ❖ La administración del agonista de GnRH de liberación prolongada, acetato de deslorelina, en gatas con el 50% del peso corporal adulto, postpone la pubertad (aproximadamente 100 días) y disminuye el desarrollo de folículos antrales, sin alterar el crecimiento. Aunque la aparición de efectos colaterales es baja, éstos debe considerarse al usar formulaciones de larga duración.

- ❖ Por último, en la gata doméstica, el método para la extracción de esteroides gonadales en materia fecal propuesto permitió diferenciar las distintas etapas del ciclo estral, teniendo una alta correlación con la progesterona sérica y los hallazgos fisiológicos. Este método resulta sumamente útil y sencillo para el monitoreo endocrino de esta especie.

ANEXOS