



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

# **TESIS DOCTORAL**

**M.V. GUADALUPE GARCÍA ROMERO**

2011



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

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

**EFFECTOS REPRODUCTIVOS, ENDOCRINOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DEL  
ANTAGONISTA DE GNRH, ACYLINE, EN CANINOS Y FELINOS MACHOS**

**AUTOR: GARCÍA ROMERO, Guadalupe, MV**  
**DIRECTOR: GOBELLO, Cristina, DMV, DECAR**  
**CODIRECTOR: FERNÁNDEZ, Patricia Elena, DMV**

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

**MIEMBROS DEL JURADO:**

**Dr. CETICA, Pablo**

**Dra. FURNUS, Cecilia**

**Dra. GONZALEZ, Griselda**

**Año 2011**

*A todas las personas que de una manera u otra  
me acompañaron en este camino*

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ En primer lugar, a mi directora, la Dra. Cristina Gobello, quien me dió la oportunidad de conocer el mundo de la investigación, y que, con gran dedicación y compromiso, me orientó metódicamente en esta tarea.
- ❖ A mis codirectores, los Dres. Patricia Fernández y Claudio Barbeito, por instruirme, aconsejarme y aportar una visión crítica a este trabajo. Por su gran predisposición y ayuda.
- ❖ A mis padres y abuelos, por creer en mí, por su invaluable esfuerzo para brindarme la educación necesaria para llegar hasta acá. Por ser un ejemplo de esfuerzo y dignidad.
- ❖ A mi hermana, sobrinos, cuñados, primos, tías, suegros, porque sin ellos no sería quien soy.
- ❖ A mi abuela Ema, tía Amanda, tío Omar, y a mis bisabuelas Juana y Ernestina, que donde quiera que estén me dan las fuerzas necesarias para seguir adelante.
- ❖ A Fede, mi amor, mi compañero, mi amigo. Por su interminable buen humor y enorme paciencia. Por estar siempre.
- ❖ A mis compañeros de trabajo, Car, Pau, Merce, Anita, Jorge, Pablo, Patricio, por su colaboración, dedicación y buena predisposición, y muy especialmente a Analía, porque en ella encontré una amiga incondicional.

- ❖ A la Dra. Yanina Corrada, por tener siempre el tiempo para escucharme y brindarme sus consejos, pero por sobre todo por su enorme calidez humana.
- ❖ A mis compañeros de la Cátedra de Fisiología por proporcionarme no solo un espacio físico donde realizar mi trabajo sino también por hacerme sentir como en casa.
- ❖ A los Dres. Alejandro Relling, Guillermo Mattioli y Mauricio Giuliadori por su incansable paciencia y ayuda desinteresada que contribuyeron a mi crecimiento.
- ❖ Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme una beca tipo I para dedicarme de manera exclusiva a mis estudios de doctorado, y por proporcionar parte de la financiación de esta tesis.
- ❖ A la Facultad de Ciencias Veterinarias y a la Universidad Nacional de La Plata por brindarme de manera gratuita una formación académica de excelencia, y por permitirme a través de sus incentivos docentes llevar a cabo parte de este estudio.
- ❖ Al Contraception & Reproductive Health Branch Center for Population Research, NIH, USA, por la provisión de acyline.
- ❖ A los propietarios, por confiar en mí y permitirme incluir a sus mascotas en los experimentos de este trabajo.
- ❖ A todos mis amigos, por ser una parte fundamental de mi vida.
- ❖ A Catalina, mi gata, por tanto amor. Y a todas las mascotas, participantes o no de esta Tesis, por hacer de éste un mundo más agradable

## PRÓLOGO

*"Los conceptos y principios fundamentales de la ciencia son invenciones libres del espíritu humano."*

*Albert Einstein*

El presente Trabajo de Tesis se desprende de una línea de investigación en la cual nuestro grupo ha dedicado su esfuerzo desde hace más de 10 años, y es el fruto de un arduo período de trabajo realizado con entusiasmo y dedicación.

Como es sabido, el estudio de la contracepción en pequeños animales se ha enfocado principalmente en las hembras, siendo escaso en caninos y felinos machos. En los últimos años la población canina y felina en estado de abandono ha sufrido un aumento alarmante. Por este motivo, es de fundamental importancia el desarrollo de métodos contraceptivos que permitan facilitar el control reproductivo masivo de estas especies de manera segura y eficaz. Por otro lado, el incremento de la cría de perros y gatos de raza en las últimas décadas hace imperiosa la necesidad de protocolos que permitan la optimización de la eficiencia reproductiva en estas especies. Es por ello que esta Tesis consiste en una serie de capítulos en los que se estudia un nuevo compuesto que ha sido utilizado en otras especies. Cada capítulo consta de experimentos independientes en los que se detallan los cambios endocrinológicos y gonadales producidos por esta droga a modo de contribuir al conocimiento de su mecanismo de acción en perros y gatos machos. Se incluye además, la validación de un modelo para el estudio de drogas a nivel testicular.

De esta manera, esta obra intenta aportar herramientas útiles para posteriores estudios a fin de permitir una mejora en el manejo reproductivo de los pequeños animales.

**PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS****INTRODUCCIÓN GENERAL**

- ❖ Valiente C., **García Romero G.**, Gobello C. Uso de análogos de GnRH en el control de la reproducción indeseada canina. Revisión. *Analecta Veterinaria* 2008; 28(2):45-51. FCV-UNLP.
  
- ❖ Valiente C., **García Romero G.**, de la Sota P.E., Corrada Y., Tórtora M., Rodríguez R., García P., Blanco P., Dragonetti A., Arias D., Gobello C. Uso de análogos de la GnRH en el control de la reproducción indeseada en caninos domésticos. Jornada Científico Tecnológica de la FCV-UNLP. La Plata, Argentina. 27/11/2007 (abstract).

**CAPÍTULO I**

- ❖ **García Romero G.**, Valiente C, Aquilano D, Corrada Y, Gobello C. Endocrine effects of the GnRH antagonist, acyline, in domestic dogs. *Theriogenology* 2009;71(8)1234-7.
  
- ❖ **García Romero G.**, Mattioli G., Rosa D., Diaz JD., Abeyá M., Gobello C. A single administration of the GnRH antagonist acyline inhibits basal and GnRH-stimulated serum testosterone concentrations in male dogs. *Reproduction in Domestic Animals* (en prensa).

- ❖ Valiente C, **García Romero G**, Corrada Y, Blanco PG, de la Sota PE, Gobello C. Endocrine effects of the GnRH antagonist, acyline, in domestic dogs. Latin American Veterinary Conference (LAVC). Lima, Perú. 16-19/10/2009 (abstract).
- ❖ **García Romero G.**, Risso A., Valiente C., Corrada Y., Rodríguez R., Gobello C. Endocrine response to exogenous GnRH in male dogs treated with a GnRH antagonist. II Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. Buenos Aires, Argentina. 26/11/2010 (abstract).
- ❖ **García Romero G.**, Tórtora M., Diaz J., Rodríguez R., Abeyá M., Gobello C. A single administration of a GnRH antagonist inhibited canine gonadal axis functionality during 14 days. Society for Theriogenology Annual Conference. Milwaukee, Wisconsin, USA. 9-13/8/2011 (abstract).

## CAPÍTULO II

- ❖ **García Romero G.**, Barbeito C., Fernández P., Gimeno E., Gobello C. Effect of unilateral orchidectomy on testicular characteristics of the domestic cat. Tissue and Cell (enviado).
- ❖ **García Romero G.**, Sirini M., Risso A., Fernández P., Gobello C., Barbeito C. Effect of unilateral orchidectomy on testicular characteristics of the domestic cat. Society for



Theriogenology Annual Conference. Milwaukee, Wisconsin, USA. 9-13/8/2011 (abstract).

- ❖ **García Romero G.**, García P., Risso A., Sirini M., Fernández P., Barbeito C., Gobello C. Efecto de la orquiectomía unilateral sobre las características testiculares del gato doméstico (*Felis catus*). VII Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Mar del Plata, Argentina. 2-3/9/2011 (abstract).

### CAPÍTULO III

- ❖ **García Romero G.**, Fernández P., Gimeno E., Barbeito C., Gobello C. Effects of the GnRH antagonist acyline on the testis of the domestic cat (*Felis catus*). The Veterinary Journal (en prensa).
  
- ❖ **García Romero G.**, Fernández P.E., Barbeito C., Gobello C. Effects of the GnRH antagonist, acyline on domestic cat (*Felis catus*) testis. Primer Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal. Viña del Mar, Chile. 7-8/11/2011 (abstract).

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>SUMMARY</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	6
 <b>CAPÍTULO I</b>	
<i>Efectos endocrinológicos del antagonista de GnRH, acyline, en caninos domésticos</i> .....	14
 <b>CAPÍTULO II</b>	
<i>Efecto de la orquiectomía unilateral sobre las características testiculares del gato doméstico (<i>Felis catus</i>)</i> .....	31
 <b>CAPÍTULO III</b>	
<i>Efectos del antagonista de GnRH, acyline, sobre el testículo del gato doméstico (<i>Felis catus</i>)</i> .....	40
 <b>CONCLUSIONES FINALES</b> .....	57
 <b>ANEXOS</b> .....	59

**ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y FOTOS****CAPITULO I:**

- *Figura 1*.....16
- *Figura 2*.....19
- *Figura 3*.....19
- *Figura 4*.....20
- *Figura 5*.....20
- *Figura 6*.....22
- *Figura 7*.....24
- *Figura 8*.....25

**CAPITULO II:**

- *Tabla 1*.....35
- *Foto 1*.....35

**CAPITULO III:**

- *Tabla 1*.....42
- *Tabla 2*.....45
- *Tabla 3*.....46
- *Tabla 4*.....48
- *Foto 1*.....49
- *Foto 2*.....50

## ABREVIATURAS

**GnRH:** hormona liberadora de gonadotrofinas

**FSH:** hormona folículo estimulante

**LH:** hormona luteinizante

**T:** testosterona

**sc:** subcutánea

**P<sub>4</sub>:** Progesterona

**SEM:** error estándar de la media

**RIA:** radioinmunoensayo

**CV:** Coeficiente de variación

**OD:** Orquiectomía derecha

**OI:** Orquiectomía izquierda

**ANOVA:** Análisis de varianza

## **EFFECTOS REPRODUCTIVOS, ENDOCRINOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DEL ANTAGONISTA DE GnRH, ACYLINE, EN CANINOS Y FELINOS MACHOS**

**Palabras claves:** canino, felino, antagonista de GnRH, reproducción, histología

### **RESUMEN**

Con el objetivo de contribuir al desarrollo del control farmacológico de la reproducción en caninos y felinos machos, el presente Trabajo de Tesis consistió en describir los efectos endocrinos e histológicos reproductivos de un antagonista de tercera generación del factor liberador de gonadotropinas (GnRH), acyline, en estas especies. En el primer capítulo, con un diseño aleatorizado y con grupo control, se utilizaron un total de 13 perros para evaluar el efecto del acyline sobre las concentraciones séricas basales de las hormonas folículoestimulante (FSH), luteinizante (LH), y testosterona (T). Secundariamente, se describió la respuesta del eje gonadal a la estimulación con GnRH luego de la administración del antagonista. En el tercer capítulo, se describieron los efectos del acyline sobre las características macroscópicas y microscópicas testiculares en 12 felinos machos. Previamente, y a fin de poder usar animales hemicastrados en el experimento anterior, en el segundo capítulo se describió el efecto de la castración unilateral en gatos machos adultos. Así, una única dosis de acyline disminuyó las concentraciones séricas de FSH, LH y T, por debajo de los niveles basales durante 9 días, e impidió la respuesta del eje gonadal a la

estimulación agonística por 14 días. Se comprobó que la hemicastración en felinos adultos no causa hipertrofia compensatoria del testículo remanente, resultando éste un modelo de utilidad para el siguiente estudio. El mismo tratamiento con acyline, demostró interrumpir la espermatocitogénesis y espermiogénesis, y deteriorar severamente la calidad seminal durante dos semanas en gatos. Ninguno de los animales tratados en los experimentos presentó efectos colaterales locales ni sistémicos. Los antagonistas de GnRH se vislumbran como fármacos efectivos y seguros para el manejo reproductivo (por ejemplo: contracepción, biotecnología y tratamiento de enfermedades hormono-dependientes) en los pequeños animales.

## **ENDOCRINOLOGICAL AND HISTOLOGICAL REPRODUCTIVE EFFECTS OF THE GnRH ANTAGONIST ACYLINE ON CANINE AND FELINE MALES**

**Keywords:** canine, feline, GnRH antagonist, reproduction, histology

### **ABSTRACT**

To contribute to the development of the pharmacological control of reproduction in canines and felines, this Thesis described the endocrinological and histological reproductive effects of a third generation gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist, acyline, on males of these species. In the first chapter, using a randomized controlled design, thirteen dogs were used to evaluate the effect of acyline on serum concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), and testosterone (T). Secondly, the gonadal axis response to GnRH stimulation after administration of the antagonist was also described. In the third chapter, the effects of acyline on macroscopic and microscopic testicular characteristics in twelve male cats were assessed. In order to use hemicastrated animals in the previous experiment, the effect of unilateral castration in adult male cats was described in the second chapter. A single dose of the GnRH antagonist, acyline, decreased serum concentrations of FSH, LH, and T below baseline levels for 9 days, and prevented gonadal axis response to agonistic stimulation for 14 days. It was demonstrated that in mature cats hemicastration did not provoke compensatory hypertrophy of the remaining testis, appearing as a useful model

for the next study. In cats, the same treatment with acyline disrupted spermatocitogenesis and spermiogenesis, and severely impaired semen quality for two weeks. None of the animals included in these studies presented any local or systemic side effects. GnRH antagonists appeared as safe and effective drugs for reproductive management (e.g. contraception, biotechnology and hormone-dependent diseases treatments) in small animals.



## INTRODUCCIÓN GENERAL

El control de la población canina y felina es un problema complejo, aún lejos de estar resuelto, tanto a nivel nacional como internacional. Los análogos de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) se han usado en otras especies con el propósito de controlar la reproducción de manera eficaz e inocua. La GnRH, un decapeptido hipotalámico sintetizado y liberado de manera pulsátil desde las células neurosecretoras hipotalámicas, regula la síntesis y liberación de las gonadotrofinas hipofisarias folículoestimulante (FSH) y luteinizante (LH), que a su vez regulan las funciones esteroideogénicas y gametogénicas de las gónadas (1). Estas hormonas son esenciales para la proliferación y diferenciación del epitelio seminífero, y la ausencia de las mismas provoca la pérdida progresiva de las células germinales (2).

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 compuestos con mayor potencia, duración y efectividad que la GnRH endógena (3). Esto se logró incrementando su afinidad por los receptores y disminuyendo su degradación o eliminación. Los agonistas de GnRH actúan por desensibilización de los receptores de GnRH, lo cual resulta en una regulación negativa del eje gonadal (4). La principal desventaja de los agonistas es que causan una liberación inicial de gonadotrofinas, efecto denominado “flare up”, lo que limita severamente su aplicación práctica. Contrariamente, los antagonistas de GnRH bloquean competitivamente e inhiben la expresión del gen del receptor de GnRH, dando lugar a una supresión pituitaria inmediata (5). Estos compuestos han demostrado tener un potencial uso en el manejo médico de enfermedades hormono-dependientes (neoplásicas o no), la

prevención de efectos citotóxicos de la quimioterapia, la contracepción, y en protocolos de fertilización *in-vitro*.

El efecto de los antagonistas de GnRH ha sido ampliamente reportado en primates y modelos murinos (6,7). En estas especies evidenciaron suprimir severamente la secreción de gonadotropinas y esteroides sexuales, y este efecto se ha asociado a cambios atróficos testiculares, incluyendo la inhibición de la espermatogénesis (8,9).

La información sobre los antagonistas de GnRH en pequeños animales es limitada. En la especie canina, el efecto de los antagonistas de GnRH fue descrito hace casi tres décadas, cuando solo estaban disponibles los compuestos de primera generación (4,10). Se demostró que una única aplicación (2 mg/kg) o inyecciones diarias (300 µg/kg) durante 7 a 14 días de un antagonista de segunda generación, el detirelix, suprime la progresión del ciclo estral y la ovulación en perras (4). El mismo protocolo farmacológico interrumpió la fase lútea media en hembras caninas preñadas y vacías (10). En perros machos, este antagonista (administrado en dosis de 2-4 mg/kg), generó una declinación de la concentración de testosterona (T) sérica en forma dosis y tiempo dependiente. Con dosis de 100 µg/kg/día de detirelix se abolió totalmente la espermatogénesis (4). Las primeras generaciones de los antagonistas requerían altas dosis para mantener una adecuada supresión de los receptores de GnRH (11) y tenían una solubilidad muy limitada. Además, las reacciones de hipersensibilidad causadas por estos primeros antagonistas impidieron más investigaciones. Todos estos problemas fueron superados, en su mayor parte, con la aparición de la tercera generación de antagonistas, que incluye al teverelix, el abarelix, el cetorelix, el ganirelix y el acyline entre otros, los que son bien tolerados en varias especies incluso el perro (12,13).

Recientemente, luego de un intervalo de más de 20 años, algunos trabajos mostraron la eficacia clínica y seguridad de los antagonistas de GnRH de tercera generación (13-16) en perros machos y hembras, y en hembras felinas (17).

El acyline es un antagonista de GnRH reconocido por su potencia, seguridad y efecto prolongado (18). En la especie canina se estudió el efecto de una única administración de acyline (330  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sc) sobre los parámetros testiculares, observándose una disminución de la consistencia y el diámetro escrotal, la libido y la erección, especialmente en las primeras cuatro semanas post tratamiento. También se obtuvo un decrecimiento del volumen seminal y de la concentración y la motilidad espermática. Estos últimos parámetros mostraron una creciente mejoría hacia el final del estudio, unas ocho semanas luego de la aplicación del antagonista. El número de morfoanomalías espermáticas se incrementó durante la cuarta y sexta semana post aplicación (13). La misma droga y dosis, en hembras caninas, interrumpió el ciclo estral temprano, provocando una significativa disminución del tamaño y la turgencia vulvar dentro de las primeras 36 horas post aplicación. La descarga vaginal propia del proestro se redujo a cantidades mínimas y se tornó menos sanguinolenta. Por su parte, la citología vaginal viró rápidamente de proestro a diestro en menos de una semana. Ninguna de estas hembras tratadas ovuló, como lo demostró la concentración basal de progesterona ( $\text{P}_4$ ). El retorno al ciclo estral ocurrió  $19,7 \pm 3,6$  días después de terminado el tratamiento (16). En otra publicación, se aplicaron dos dosis diferentes de acyline a 14 perras preñadas con el propósito de inducir el aborto. Se utilizó una dosis baja (110  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sc) y otra más alta (330  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sc) entre los 25 y 35 días luego del primer servicio. Todas las perras tratadas abortaron en un promedio de  $7 \pm 1,9$  y  $6,4 \pm 1,3$  días post-tratamiento para la dosis baja y alta, respectivamente. La concentración sérica de  $\text{P}_4$  declinó a niveles basales en los grupos que recibieron el acyline, independientemente de la dosis (15). En otro estudio en perras, se

combinaron un agonista y un antagonista con la intención de evitar el efecto estimulante inicial de los agonistas en hembras en anestro. Para este fin, se aplicó el acyline (330 µg/kg sc) en dos tiempos distintos (simultáneamente o a las 48 horas) luego de la aplicación de un agonista de larga duración. La respuesta estral post-implante ocurrió en el 100% de perras. Aunque esta respuesta no pudo evitarse, en los grupos tratados con acyline hubo una tendencia a una aparición más tardía de la misma, provocada por el bloqueo antagonístico (14).

Por su parte, en gatas, la misma dosis de este antagonista previno la ovulación cuando se administró en la fase folicular temprana (proestro), pero no afectó la función lútea durante la preñez (17). El acyline demostró, en otras especies, suprimir la concentración de gonadotrofinas durante dos semanas luego de una única aplicación (12,19). En todos los casos, los efectos de este nuevo antagonista de GnRH fueron reversibles y completamente privados de las reacciones adversas que provocaban las generaciones anteriores de estos compuestos.

Aunque los antagonistas de GnRH tienen un lugar prometedor en el futuro de la reproducción canina y felina se necesitan aún más estudios de laboratorio y de campo. El conocimiento detallado de los efectos endocrinológicos e histológicos de los antagonistas de GnRH es necesario antes de que los antagonistas puedan ser ampliamente recomendados en estas especies. Por lo anteriormente expuesto los objetivos planteados fueron los siguientes:

### ***Objetivo general***

Contribuir al desarrollo del control farmacológico de la reproducción en caninos y felinos.

### ***Objetivos específicos***

#### ***Capítulo I***

Describir el efecto de una única aplicación del antagonista de GnRH, acyline, sobre las concentraciones séricas basales de hormona folículo-estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), y testosterona (T) y, secundariamente, la respuesta del eje gonadal a la estimulación con GnRH en perros tratados con acyline.

#### ***Capítulo II***

Describir el efecto de la castración unilateral sobre las características macroscópicas e histológicas testiculares en felinos domésticos adultos.

#### ***Capítulo III***

Describir los efectos de una única aplicación del antagonista de GnRH acyline sobre las características macroscópicas y microscópicas testiculares del gato doméstico.

### **Referencias**

- 1) Karten MJ, Rivier JE. Gonadotrophin releasing hormone analog design. Structure function studies toward the development of agonists and antagonists, rationale and perspective. *Endocr. Rev.* 1986;44–66.

- 2) Weinbauer GF, Nieschlag E. The Leydig cell as a target for male contraception. En: The Leydig Cell 1996, pp 629-62. Eds Payne AH, Hardy MP, Rusell LD. Vienna: Cache River Press.
- 3) Padula AM. GnRH analogues-agonists and antagonists. Anim. Reprod. Sci. 2005;88(1-2):115-26.
- 4) Vickery BH, Mc Rae GI, Goodpasture JC, Sanders LM. Use of potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination. J. Reprod. Fertil. 1989;39:175-87.
- 5) Heber D, Dobson R, Swerdloff RS, Channabasavaiah K, Stewart JM. Pituitary receptor site blockade by a gonadotrophin-releasing antagonist in vivo: mechanism of action. Science 1982;216:420-1.
- 6) Weinbauer G, Nieschlag E. Comparison of the antigonadotropic activity of three GnRH antagonists (Nal-Glu, Antide and Cetrorelix) in a non-human primate model (*Macaca fascicularis*). Androl. 1993, 25:141-147.
- 7) Sinha-Hikim AP, Swerdloff RS. Temporal and stage-specific changes in spermatogenesis of rat after gonadotropin deprivation by a potent gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. Endocrinology 1993, 133:2161-2170.
- 8) Smithwick EB, Young LG. Effects of androgen deprivation on the histology of adult chimpanzee testis. Tissue Cell 2001a, 33(3):262-272.
- 9) Misro MM, Ganguly A, Das RP. Adverse effects of chronic GnRH antagonist administration on seminiferous epithelium in adult rats. Arch. Androl. 1992, 29(1):69-78.
- 10) Vickery BH, Nestor JJ. LHRH analogues, development and mechanism of action. Sem. Reprod. Endocrinol. 1987;5:353-70.

- 11) Vickery BH. Comparisons of the potential utility of LHRH agonists and antagonists for fertility control. *J. Steroid. Biochem.* 1985;23(5B):779-91.
- 12) Herbst KL, Coviello AD, Page S, Amory JK, Anawalt BD, Bremmer WJ. A single dose of the potent GnRH antagonist Acyline suppresses gonadotrophins and testosterone for 2 weeks in healthy young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89(12):5959-65.
- 13) Valiente C, Corrada Y, de la Sota PE, Galassi Gerez P, Gobello C. Effect of the GnRH antagonist, acyline, on canine testicular characteristics. *Theriogenology* 2007; 15;68(5):687-92.
- 14) Valiente C, Hermo G, Zugak K, Garcia P, Corrada Y, Gobello C. A combination of a GnRH agonist and an antagonist at two different time points in anestrous bitches. *Reprod. Domest. Anim.* 2008;43:127–8 [abstract].
- 15) 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; 44(2):156–9.
- 16) Valiente C, Garcia Romero G, Corrada Y, de la Sota PE, Hermo G, Gobello C. Estrous cycle interruption with a low and a high dose of the GnRH antagonist, acyline, in bitches. *Theriogenology* 2009;79:408–11.
- 17) Risso A, Valiente C, Corrada Y, Garcia Romero G, Blanco PG, 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(7):984-7.
- 18) Herbst KL, Anawalt BD, Amory JK, Bremmer WJ. Acyline: The first study in humans of a potent new GnRH antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:3215-3220.

- 19) Herbst K.L. Gonadotrophin releasing hormone antagonists. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2003;Pp 1-7.



## CAPÍTULO I

### EFFECTOS ENDOCRINOLÓGICOS DEL ANTAGONISTA DE GNRH, ACYLINE, EN CANINOS DOMÉSTICOS

#### **Introducción**

En la terapéutica canina existe una tendencia al reemplazo de los tradicionales esteroides gonadales, que son ampliamente conocidos por sus efectos secundarios, por compuestos farmacológicos no esteroides (1,2). En este sentido, los análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), agonistas y antagonistas, tienen un potencial considerable para regular la reproducción canina de forma segura y reversible. Por otra parte, los antagonistas tienen ventaja sobre los agonistas debido a su inmediata acción inhibitoria (3).

Si bien en el perro el futuro de los antagonistas de GnRH para el control de enfermedades hormono-dependientes y la reproducción en general (4) es prometedor, es muy poco lo que se conoce acerca de sus efectos endocrinos. Tampoco se conoce la funcionalidad del eje gonadal durante el tratamiento con los antagonistas en esta especie. El conocimiento detallado de estos efectos mejorará, en gran medida, su futura aplicación práctica y resulta absolutamente necesario para que los antagonistas de GnRH puedan ser ampliamente recomendados en la

especie. Por todo esto se plantearon dos experimentos cuyos objetivos fueron describir el efecto de una dosis del antagonista de GnRH, acyline, sobre las concentraciones séricas basales de hormona folículo-estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), y testosterona (T) y, secundariamente, la respuesta del eje gonadal a la estimulación con GnRH en perros tratados con acyline.

## **Experimento I**

### **Materiales y Métodos**

#### *Animales*

Para este estudio se utilizaron 5 perros reproductivamente normales (estado determinado por evaluaciones físicas y seminales), mestizos, de entre 2 a 5 años y 16 a 31 kg de peso. Los perros se alojaron en caniles bajo fotoperiodo natural y se alimentaron con alimento balanceado comercial y agua *ad libitum*.

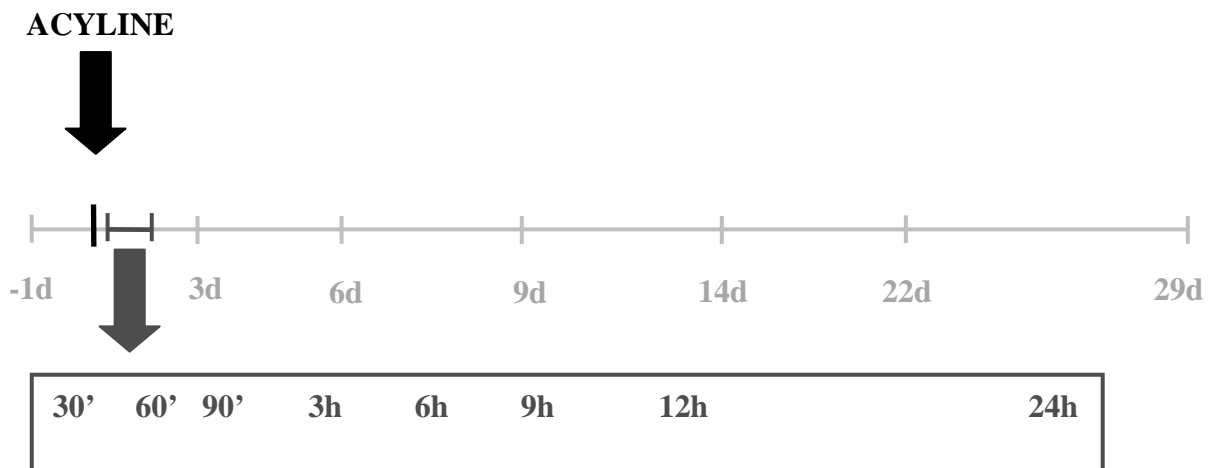
Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP (CICUAL, Número 129/09).

*Protocolo farmacológico y muestreos sanguíneos*

Los perros se evaluaron durante 30 días. El día 0 del protocolo experimental se les inyectó acyline (Contraception and Reproductive Health Branch Center for Population Research, NIH, Bethesda, MD, USA) 330  $\mu\text{g}/\text{kg}$  subcutáneo (sc) a la totalidad de los animales. El acyline se presenta en forma de polvo liofilizado, el cual debe resuspenderse en agua destilada (2 mg/ml) para su administración. La dosis utilizada en este experimento se eligió en base a estudios clínicos previos (5).

Las muestras sanguíneas se colectaron por venopunción periférica el día anterior al tratamiento (Día -1) y luego 30, 60, y 90 minutos; 3, 6, 9, 12 y 24 horas; y 3, 6, 9, 14, 22 y 29 días después del mismo, para la determinación de las concentraciones de FSH, LH y T séricas. La primera, y las últimas siete muestras se colectaron entre las 9:00 y 11:00 horas. Todas las muestras de sangre se centrifugaron durante 15 minutos (3000 x g), se obtuvo el suero y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

**Figura 1:** Diseño del Experimento I



### *Determinaciones hormonales*

La concentración sérica de FSH se determinó por un ensayo inmunoradiométrico homólogo (IRMA, Biocode®, Liege, Bélgica), mientras que la LH se midió por un radioinmunoensayo homólogo (RIA, Biocode®, Liege, Bélgica). La sensibilidad para estos *kits* fue de 0,2 y 0,3 ng/ml, respectivamente. La testosterona se determinó mediante un radioinmunoensayo comercial de fase sólida (Coat-A-Count, DPC®, Los Angeles, CA, USA). La sensibilidad del *kit* fue de 0,04 ng/dl. Todas las muestras de cada animal se determinaron en el mismo ensayo, para reducir los efectos de la variación entre los mismos. Para los tres ensayos hormonales, los CVs intra e inter-ensayo fueron <10%.

### *Análisis estadístico*

Las concentraciones séricas de FSH, LH y T, se expresaron como media $\pm$ SEM. La comparación entre los tiempos (relativo a la concentración pre-tratamiento) se llevó a cabo por un ANOVA de mediciones repetidas en el tiempo, seguido por un test de Tukey. También se determinaron correlaciones entre las concentraciones de LH y T para los días 1 al 9. El análisis estadístico fue realizado con Sigma Stat (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), y el nivel de significancia se fijó en  $P < 0,05$ .

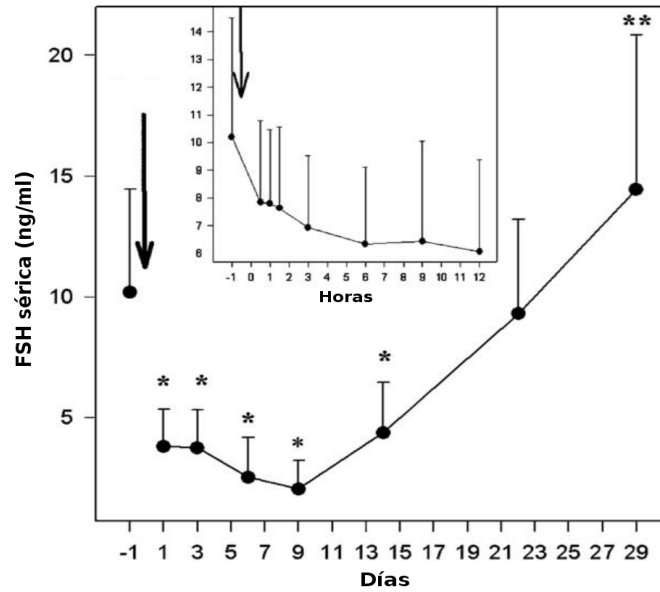
## Resultados

Las concentraciones de FSH, LH y T variaron a lo largo del periodo de estudio ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ; y  $P < 0,01$ , respectivamente; **Figs. 2-4**). En respuesta al tratamiento con acyline, las concentraciones de FSH y LH disminuyeron por debajo de los valores pre-tratamiento (basales) 60 minutos después del tratamiento ( $P > 0,05$ ), mientras que la T tardó 90 minutos en descender debajo del valor basal ( $P > 0,05$ ). Las concentraciones de las tres hormonas disminuyeron hasta el día 9, cuando alcanzaron el nadir. En ese momento, los niveles de T fueron inferiores a aquellos encontrados luego de la castración ( $\leq 0,5$  ng/ml) en 4 de los 5 perros. Las concentraciones séricas de LH y T se correlacionaron positivamente entre los días 1 al 9 ( $r = 0.60$ ,  $P < 0,01$ ; **Fig. 5**).

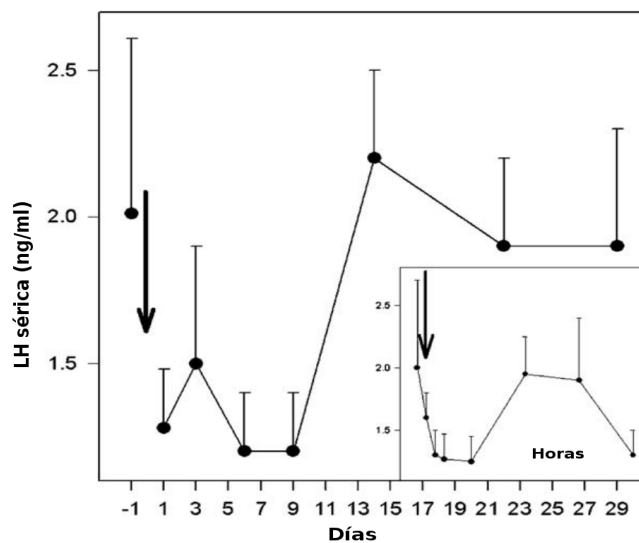
Las concentraciones séricas de las tres hormonas comenzaron a aumentar el día 14, aunque los niveles de FSH y T se mantuvieron por debajo de los valores basales en ese día ( $P > 0,05$ ). Las concentraciones de FSH y T alcanzaron valores por encima de los basales el día 29, mientras que las concentraciones de LH en ese momento fueron similares a las basales ( $P > 0,05$ ).

Durante el presente estudio, no se observaron efectos colaterales, locales o sistémicos, clínicos ni de comportamiento en ninguno de los perros tratados con acyline.

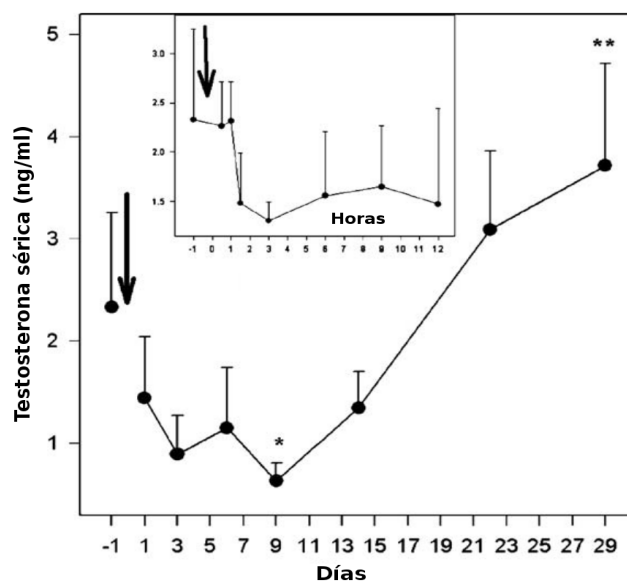
**Fig. 2.** Concentraciones séricas de FSH (media±SEM) antes y después de una única administración sc de 330 µg/kg de acyline (flechas) en 5 perros machos. Los asteriscos representan las concentraciones que difirieron significativamente ( $P<0,01$ ). El recuadro muestra las primeras 12 hs luego de la inyección.



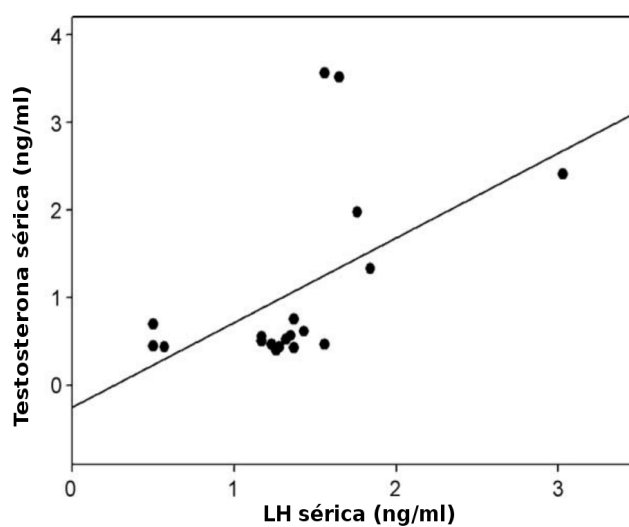
**Fig. 3.** Concentraciones séricas de LH (media±SEM) antes y después de una única administración sc de 330 µg/kg de acyline (flechas) en los 5 perros machos de la Fig. 1 ( $P<0,05$ ). El recuadro muestra las primeras 12 hs luego de la inyección.



**Fig. 4.** Concentraciones séricas de T antes y después de una única administración sc de 330  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de acyline (flechas) en los 5 perros machos de la Fig. 1. Los asteriscos representan las concentraciones que difirieron significativamente ( $P < 0,01$ ). El recuadro muestra las primeras 12 hs luego de la inyección.



**Fig. 5.** Correlación entre las concentraciones séricas de LH y T entre los días 1 al 9 ( $r = 0,60$ ;  $P < 0,01$ ) del experimento y animales de la Fig. 1.



## **Experimento II**

### **Materiales y Métodos**

#### *Animales*

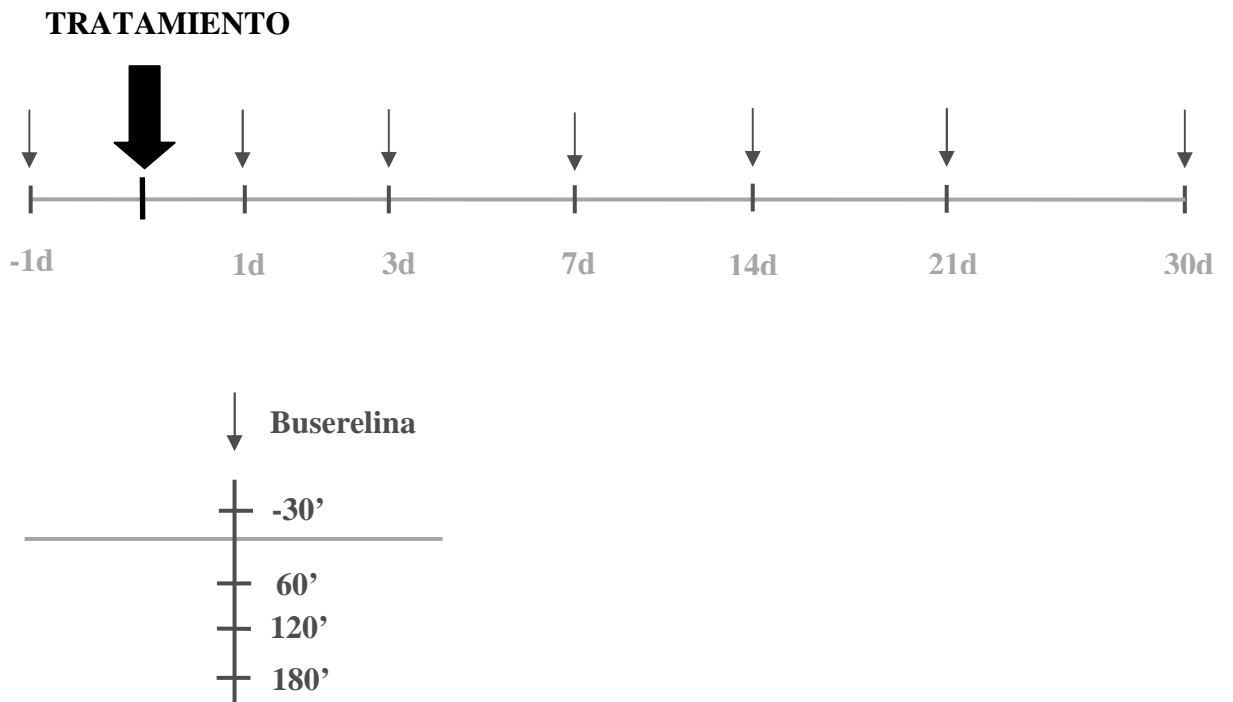
Para este estudio se utilizaron 8 perros reproductivamente normales (determinado por evaluaciones físicas y seminales), mestizos, de entre 2 a 6 años y 12 a 35 kg de peso, mantenidos bajo las mismas condiciones que en el experimento I.

#### *Protocolo farmacológico y muestreos sanguíneos*

Los perros se distribuyeron aleatoriamente en uno de los siguientes protocolos farmacológicos, administrándole el día 0 una dosis única de: 330  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de acyline sc (NIH, USA) (ACY;  $n = 4$ ) o de placebo (PLA;  $n = 4$ ), solución fisiológica administrada en el volumen correspondiente al grupo ACY. La formulación, preparación y dosis de acyline coinciden con las explicadas en el experimento I.

Los días -1, 1, 3, 7, 14, 21 y 30 se realizaron estimulaciones a todos los perros con 0,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sc del agonista de GnRH busarelina (Receptal®, Intervet, Buenos Aires, Argentina). Se colectaron muestras de sangre por venopunción periférica antes (-30 minutos) y 60, 120 y 180 minutos después de la estimulación para la determinación de T sérica.



**Figura 6:** Diseño del Experimento II

#### *Determinaciones hormonales*

Las concentraciones séricas de T se determinaron de la misma forma que lo explicado en el experimento I.

### *Análisis estadístico*

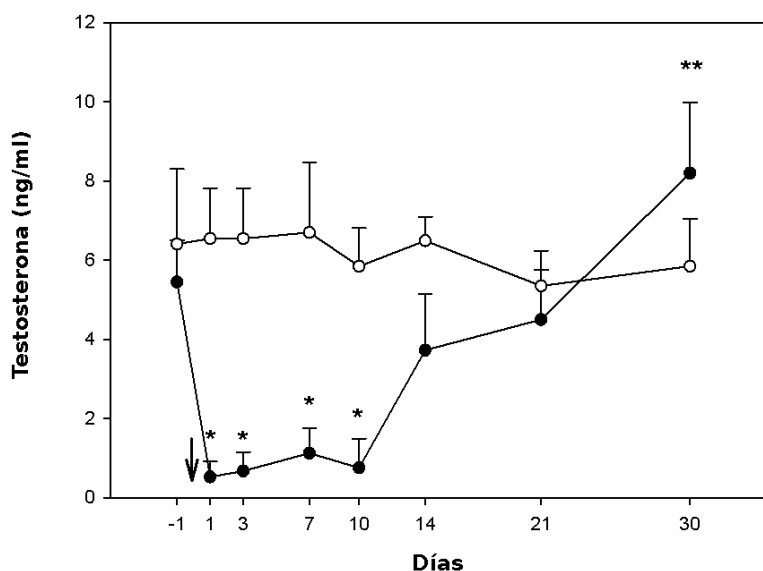
Las concentraciones séricas de T se expresaron como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . Las comparaciones intra e inter grupos se llevaron a cabo por un ANOVA de mediciones repetidas en el tiempo, seguido del test de Tukey (Sigma Stat; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). El nivel de significancia se fijó en  $P < 0,05$ .

### **Resultados**

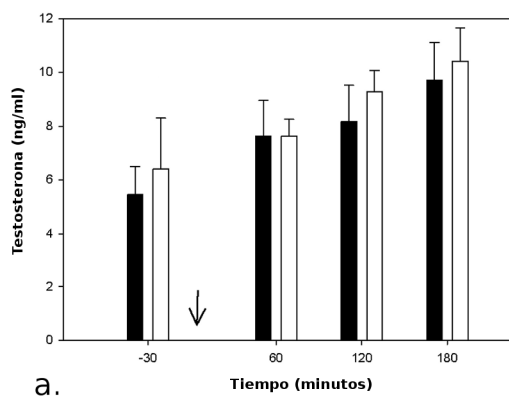
No hubo diferencias significativas en las concentraciones séricas de T antes del tratamiento entre ambos grupos ( $P > 0,1$ ). Luego de la aplicación del tratamiento, la T basal (-30 minutos) arrojó una interacción significativa entre tratamiento y día ( $P < 0,05$ ).

Cuando los grupos se analizaron por separado, la T basal varió significativamente en el grupo ACY ( $P < 0,01$ ), pero no en el PLA ( $P > 0,1$ ; **Fig. 7**). Además, en el grupo ACY, el día 30 fue diferente respecto a los días 1, 3, 7 y 10 ( $P < 0,01$ ). Solamente en el día -1, el test de estimulación presentó un efecto de tiempo ( $P = 0,05$ ), aunque en los días 1 ( $P < 0,01$ ), 3 ( $P < 0,01$ ), 7 ( $P < 0,01$ ), 10 ( $P < 0,01$ ), y 14 ( $P < 0,05$ ) la respuesta difirió entre ambos grupos, tornándose similar entre ambos grupos recién los días 21 y 30 ( $P > 0,05$ ; **Fig. 8**).

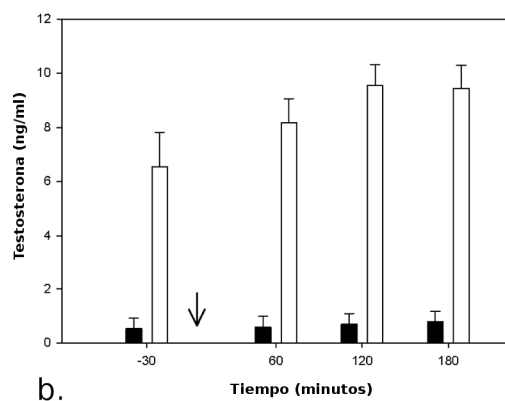
**Fig. 7.** Concentraciones séricas basales de T (media±SEM) en perros inyectados con solución fisiológica (○; PLA=4) ó 330 µg/kg de acyline (●; ACY =4), sc el día 0 (flecha). Los asteriscos representan las concentraciones que difirieron significativamente (P<0,01).



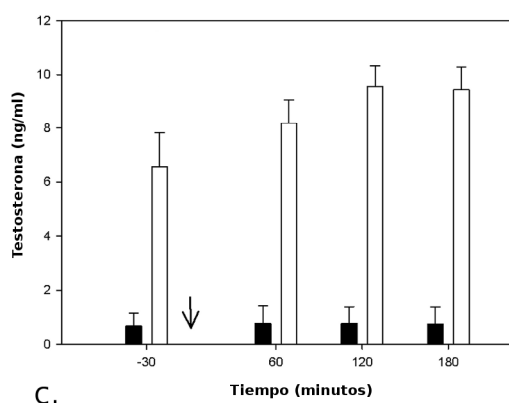
**Fig. 8.** Perfiles secretorios de T (media±SEM) en perros a través del tiempo (minutos), en respuesta a la administración sc del agonista de GnRH buserelina (flechas), los días -1 (a; P>0,1), 1 (b; P<0,01), 3 (c; P<0,01), 7 (d; P<0,01), 10 (e; P<0,01), 14 (f; P<0,05), 21 (g; P>0,05) y 30 (h; P>0,05) del periodo de estudio. Los perros fueron tratados con solución fisiológica (barras blancas; PLA=4) ó 330 µg/kg de acyline (barras negras; ACY =4) sc, el día 0.



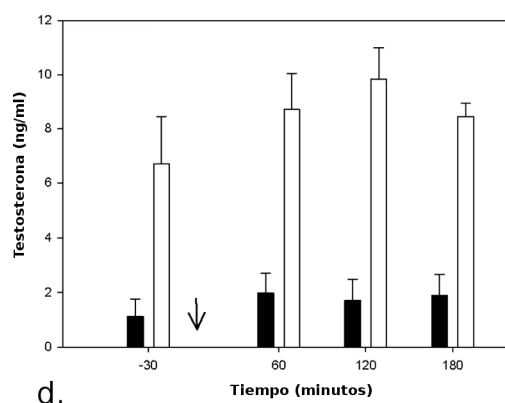
a.



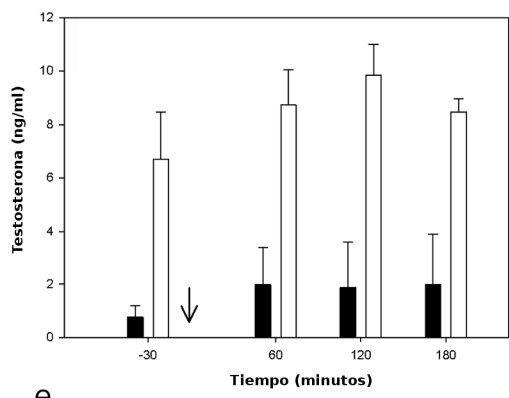
b.



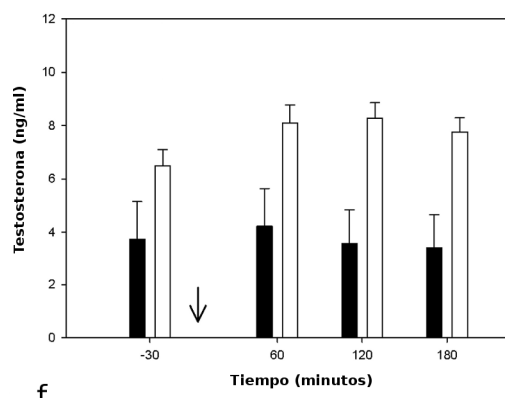
c.



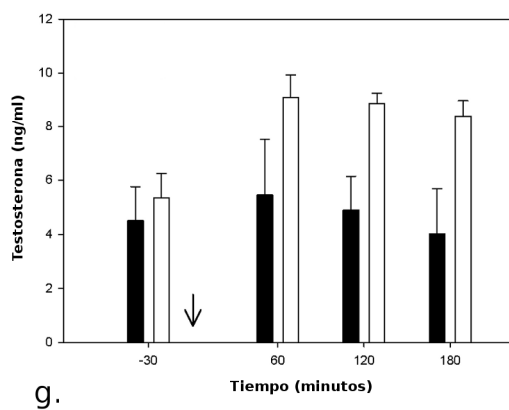
d.



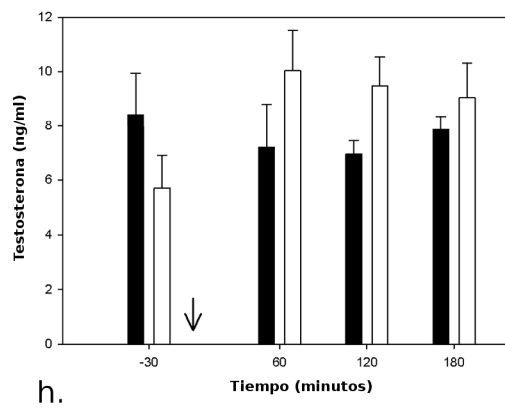
e.



f.



g.



h.

## Discusión

Como era de esperar, en el experimento I, una única inyección del antagonista de GnRH de tercera generación, acyline, disminuyó las concentraciones séricas de gonadotrofinas y T sin el aumento inicial característico de la administración de agonistas. Además, hubo una correlación positiva significativa entre la disminución de las concentraciones de LH y T, después de la administración de acyline. La supresión del eje gonadal se extendió hasta el día 9, resultando más corta que lo descrito para el hombre (14 días; 6), quizás debido a las diferencias farmacocinéticas entre las especies. De acuerdo con Junaidi y col. (2007; 7), los cambios en la concentración de T podrían reflejar las respuestas pasivas a variaciones en la secreción de LH o ser causados por modificaciones en la capacidad de respuesta de las células de Leydig a la LH. Al igual que lo descrito en humanos, aproximadamente el día 29 ocurrió un rebote en las concentraciones hormonales (6). Este aumento compensatorio es indeseable a los efectos de la supresión gonadal. Para fines prácticos, debería planificarse una nueva administración de acyline antes que las concentraciones hormonales vuelvan a sus niveles basales.

Los presentes resultados endocrinos, explican los hallazgos clínicos previos. Aproximadamente 14 días después de la administración de una única inyección de 330  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de acyline en perros se detectó pérdida de la libido e interrupción de la espermatogénesis (5). En perras, la misma dosis de acyline previno la progresión del proestro en  $3,2\pm 0,2$  días (8) y terminó la gestación en  $6,4\pm 1,3$  días (debido a la disminución en la concentración de progesterona (9). Al igual que en estudios previos en perros (5), no se detectaron efectos colaterales locales ni sistémicos, enfatizando la seguridad de este antagonista de tercera generación.

En el segundo experimento se evaluó la funcionalidad del eje gonadal en perros tratados con acyline mediante la medición de la T sérica en respuesta a estimulaciones seriadas con un agonista de GnRH. La administración de GnRH exógena se ha utilizado en muchas especies mamíferas para evaluar la función pituitaria-gonadal (10,11). Aquí, el eje gonadal fue incapaz de responder a la estimulación agonística hasta el día 14, recuperando su funcionalidad hacia el final del experimento. De la misma manera se ha demostrado una pérdida de la respuesta a la GnRH exógena luego del tratamiento con antagonistas en carneros y toros, siendo mayor en los últimos (12). Estos hallazgos son consistentes con los del experimento I y con los descritos en humanos, primates y rumiantes (6, 13-15). Al igual que en el experimento I, se produjo un aumento de la concentración basal de T al final del estudio (día 30) posiblemente debido a un efecto hiperestimulante de rebote. Coincidentemente, se ha descrito una respuesta exagerada similar en carneros previamente tratados con antagonistas de GnRH (12). Probablemente la causa de este efecto de rebote sea un aumento de la secreción de GnRH nativa por el hipotálamo, como resultado de la disminución en la supresión de la retroalimentación negativa, por la menor concentración de T o la interrupción de la regulación de asa corta de la GnRH provocada por el antagonista.

De acuerdo a los hallazgos que muestran ambos experimentos, surge la necesidad de reajustar los protocolos de administración de los antagonistas cuando se requiere un efecto a largo plazo, como es el caso de enfermedades hormono-dependientes o la contracepción. Acorde con los presentes resultados endocrinos, inyecciones seriadas de acyline cada 10 días podrían ser una opción, aunque desde una perspectiva clínica no parece práctico. También, conociendo el efecto dosis-dependiente de los antagonistas de GnRH sobre la FSH y LH (6), quizás una única dosis mayor de acyline podría suprimir las gonadotrofinas y la T por más de

10 días. La combinación de formulaciones de liberación prolongada de agonistas de GnRH y nuevos antagonistas, para prevenir los efectos iniciales de los primeros, podría también proporcionar otra opción, hasta que se desarrollen formulaciones de depósito de antagonistas. Finalmente, también se debe ser cauto al extrapolar los presentes resultados a otros antagonistas, ya que la eficacia de los análogos de GnRH depende de una compleja interacción de la potencia, dosis, velocidad de liberación y, probablemente, de factores individuales desconocidos del análogo.

En conclusión, una única dosis del antagonista de GnRH acyline, disminuyó las concentraciones séricas de FSH, LH y T en perros machos por 9 días, e impidió la respuesta del eje gonadal a la estimulación agonística por 14 días, con ausencia de efectos colaterales.

## Referencias

- 1) Romagnoli S, Concannon PW. Clinical use of progestins in bitches and queens: a review. In: Concannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C, editors. Recent Advances in Small Animal Reproduction. International Veterinary Information Service; 2003 [A1206.0903][www.ivis.org](http://www.ivis.org).
- 2) Pharmacological approaches to pregnancy termination in dogs and cats including the use of prostaglandins, dopamine agonists, and dexamethasone. Concannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C, editors. Recent Advances in Small Animal Reproduction. International Veterinary Information Service; 2003 [A1223.0802]  
[www.ivis.org](http://www.ivis.org).

- 3) Vickery BH. Comparisons of the potential utility of LHRH agonists and antagonists for fertility control. *J Steroid Biochem* 1985;23(5B):779–91.
- 4) Gobello C. New GnRH analogs in canine reproduction: a review. *Anim Reprod Sci* 2007;100:1–13.
- 5) Valiente C, Corrada Y, de la Sota PE, Galassi Gerez P, Gobello C. Effect of the GnRH antagonist, acyline, on canine testicular characteristics. *Theriogenology* 2007;68:687–92.
- 6) Herbst KL, Coviello AD, Page S, Amory JK, Anawalt BD, Bremner WJ. A single dose of the potent gonadotrophin-releasing hormone antagonist acyline suppresses gonadotrophins and testosterone for 2 weeks in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5959–65.
- 7) Junaidi A, Williamson PE, Martin GB, Stanton PG, Blackberry MA, Cummins JM, Trigg TE. Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. *Reprod Fert Dev* 2007;19 (8): 891-8.
- 8) Valiente C, Garcia Romero G, Corrada Y, de la Sota PE, Hermo G, Gobello C. Estrous cycle interruption with a low and a high dose of the GnRH antagonist, acyline, in bitches. *Theriogenology* 2009;79:408–11.
- 9) Valiente C, Corrada Y, de la Sota PE, Blanco PG, Arias D, Gobello C. Comparison of two doses of the GnRH antagonist, acyline, for pregnancy termination in bitches. *Reprod Domest Anim* 2009; 44 (2):156-9.
- 10) Chakraborty PK, Wildt DE, Seager SWJ. Serum luteinizing hormone and ovulatory response to luteinizing hormone-releasing hormone in the estrous and anestrus domestic cat. *Lab Anim Sci* 1979;29:338-44.



- 11) Brown JL, Goodrowe KL, Simmons LG, Armstrong DL, Wildt DE. Evaluation of the pituitary-gonadal response to GnRH, and adrenal status, in the leopard (*Panthera pardus japonensis*) and tiger (*Panthera tigris*). *J Reprod Fert* 1988;82:227-36.
- 12) Jimenez Severiano H, D'Occhio MJ, Lunstra DD, Mussard ML, Davis TL, Enright WJ, Kinder JE. Comparative response of rams and bulls to long-term treatment with gonadotropin-releasing hormone analogs. *Anim Reprod Sci* 2007;98(3-4):204-24.
- 13) Akhtar FB, Marshall GR, Wickings EJ, Nieschlag E. Reversible induction of azoospermia in rhesus monkeys by constant infusion of gonadotrophin-releasing hormone agonist using osmotic minipumps. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56: 534-40.
- 14) Lincoln GA, Fraser HM, Abbott MP. Blockade of pulsatile LH, FSH and testosterone secretion in rams by constant infusion of LHRH agonist. *J Reprod Fertil* 1986;77:587-97.
- 15) D'Occhio MJ and Aspden. Characteristics of Luteinizing hormone (LH) and testosterone secretion, pituitary responses to LH-releasing hormone (LHRH), and reproductive function in young bulls receiving the LHRH agonist deslorelin: Effect of castration on LH responses to LHRH. *Biol Reprod* 1996;54(1):45-52.

## CAPÍTULO II

### EFECTO DE LA ORQUIECTOMÍA UNILATERAL SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS TESTICULARES DEL GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*)

#### Introducción

En el gato doméstico (*Felis catus*) la extirpación quirúrgica de uno de los testículos es una práctica frecuente luego de un trauma, neoplasia, inflamación o torsión testicular unilateral. Por otra parte, el uso de animales hemicastrados es un reconocido modelo para el estudio de la función testicular (1) y ofrece ventajas sobre el uso de machos enteros en el estudio de los efectos de distintas drogas a nivel testicular. Además, este modelo maximiza el número de unidades experimentales pudiendo, al mismo tiempo, eliminar la variabilidad interindividual. Por estas razones, es que este modelo fue elegido para llevar a cabo el estudio perteneciente al Capítulo III del presente Trabajo de Tesis.

Por otro lado, tanto en el escenario clínico como de investigación, se plantea la pregunta si el testículo remanente sufre algún efecto luego de la escisión del contralateral. Así, luego de la hemicastración, ocurre una hipertrofia compensatoria del testículo remanente en toros (2), verracos (3), carneros (4), y caballos (5). Sin embargo, dicha hipertrofia no se detectó en ratones (6). En ratas, la magnitud de esta respuesta depende de la edad a la cual se realice (7,8). En perros adultos, los reportes son contradictorios (9,10). A pesar de la gran difusión del gato como mascota y animal de laboratorio, la investigación en reproducción felina es

claramente inferior que en las otras especies de laboratorio y domésticas. A nuestro conocimiento, no hay información sobre el efecto de la castración unilateral en la especie felina. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue describir el efecto de la castración unilateral sobre las características macroscópicas e histológicas testiculares en gatos sexualmente maduros.

## **Materiales y métodos**

### *Animales*

Se utilizaron 5 gatos machos sanos, mestizos, de entre 1 a 2 años y de 3,5 a 4,7 kg de peso, provenientes de propietarios que firmaron un consentimiento previo. Los animales estuvieron expuestos a más de 12 horas de luz por dos meses antes y después de la primer hemicastración, y se alimentaron con alimento balanceado comercial y agua *ad libitum*.

Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP (CICUAL, Número 129/09).

### *Cirugía y examen macroscópico de los testículos*

Se realizó anestesia general con xilacina (1-3 mg/kg im; Kensol ®, Köing, Buenos Aires, Argentina) y ketamina (15-25 mg/kg im; Ketmin-50®; Holliday, Buenos Aires), complementada con la aplicación de lidocaína como anestésico local (0,5 ml máximo). Luego

de las cirugías se inyectó ketoprofeno (1 mg/kg sc; Ketofen®, Fort Dodge) una vez, y luego se continuó administrando la misma droga por vía oral cada 24 horas durante 4 días. Las hemioquiectomías se realizaron a través de incisión escrotal (11), el día 0 (testículo derecho) y el día 60 (testículo izquierdo) del protocolo experimental.

Inmediatamente después de la extirpación quirúrgica, los testículos se pesaron (g) y midieron [largo (cm) y ancho (cm)] usando un calibre. También se calcularon el volumen testicular ( $\text{cm}^3$ ; 12) y el índice gonadosomático (%; 13).

#### *Evaluación histológica*

Los testículos se decapsularon, se seccionaron longitudinalmente y se colocaron en la solución fijadora de Bouin. Luego de 6 horas de fijación se transfirieron a alcohol etílico 70°. Se deshidrataron en una batería de alcoholes en concentraciones crecientes, se pasaron a xylol y se incluyeron en parafina. Luego del procesamiento, se cortaron secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las imágenes histológicas se obtuvieron con un microscopio (Olympus BX50, Tokio, Japón), con objetivos de 10x y 40x, a través de una cámara de video conectada (Sony DXC 151 CCD, Tokio, Japón) y digitalizadas en formato TIFF color de 24 bits. Se eligieron al azar 15 a 20 perfiles tubulares redondeados, para cada testículo. En los túbulos seminíferos se midieron el diámetro tubular máximo, mínimo y medio ( $\mu\text{m}$ ), eje mayor y menor ( $\mu\text{m}$ ), área ( $\mu\text{m}^2$ ) y perímetro ( $\mu\text{m}$ ) a 10x por planimetría (Image Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA). Por este método también se registró la altura del epitelio germinal ( $\mu\text{m}$ ; **Anexo, fotos 1 y 2**). El volumen ( $\text{cm}^3$ ) de los componentes testiculares se determinó por estereología mediante microscopía de luz usando

una grilla de 441 puntos sobre las fotografías a 40x (**Anexo, foto 3**). Para ello se seleccionaron 15 campos al azar (6615 puntos) para cada testículo. Los puntos se clasificaron de la siguiente forma: espermatogonias, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermátides redondas, espermátides elongadas, espermatozoides, células de Sertoli, células de Leydig, compartimento intertubular, membrana basal, lumen, detrito celular, y proporción tubular-compartimento intertubular. También se calculó la longitud total de los túbulos seminíferos (metro; 13).

Se realizó inmunohistoquímica mediante el uso del anticuerpo monoclonal de ratón antivimentina (Monoclonal Mouse Anti-Vimentin Clone 9, Dako, Carpinteria, CA, USA) para diferenciar las células de Sertoli de la hilera espermática. Como sistema de detección inmunohistoquímica se utilizó el *kit* EnVision (Dako, Carpinteria, CA, USA). Las células con inmunomarcación positiva mostraron una coloración pardo oscura, producto de la reacción de la 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloreuro- $H_2O_2$ . Después de la contraindicación con hematoxilina alcohólica, los cortes se deshidrataron y se montaron para su análisis. Las células se contaron en 20 secciones tubulares para cada testículo (**Foto 1**).

#### *Análisis estadístico*

Las variables continuas de ambos grupos (día 0 vs. día 60) se analizaron por un test de Student, y se expresaron como  $media \pm SEM$ . El nivel de significancia se fijó en  $P < 0,05$  (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

## Resultados

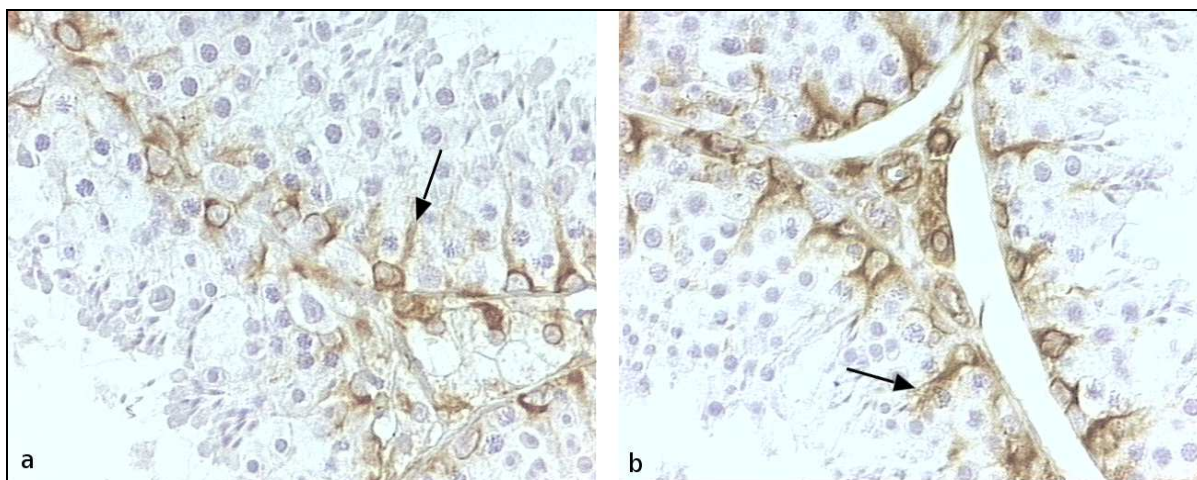
No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para los parámetros testiculares macroscópicos y microscópicos evaluados ( $P>0,1$ ; **Tabla 1**).

**Tabla 1.** Datos biométricos y morfométricos de testículos derecho e izquierdo de 5 gatos hemiorquiectomizados los días 0 y 60, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los testículos para ninguno de los parámetros estudiados ( $P>0,1$ ).

Parámetro	Testículo derecho	Testículo izquierdo
	Día 0	Día 60
Peso testicular (g)	1,54±0,4	1,7±0,2
Largo testicular (cm)	1,94±0,1	1,92±0,8
Ancho testicular (cm)	1,04±0,1	1,04±0,1
Volumen testicular (cm <sup>3</sup> )	0,95±0,1	0,95±0,1
Índice gonadosómico (%)	0,03±0,01	0,04±0,01
Diámetro tubular máximo (µm)	240,5±29,8	250,8±18,6
Diámetro tubular mínimo (µm)	166,05 ± 24,4	194,09±13,1
Diámetro tubular medio (µm)	202,56±26,2	220,91±14,9
Eje tubular mayor (µm)	240,89±29,1	247,53±18,3
Eje tubular menor (µm)	171,88±24,7	200,35±12,6
Area tubular (µm <sup>2</sup> )	35356,15±8482,8	39622,83±5193,4
Perímetro tubular (µm)	668,14±84,8	718,71±47,7
Altura del epitelio germinal (µm)	58,63±7,5	55,28±5,3
Espermatogonias (cm <sup>3</sup> )	0,056±0,01	0,052±0,01
Espermatocitos primarios (cm <sup>3</sup> )	0,10±0,1	0,11±0,1
Espermatocitos secundarios (cm <sup>3</sup> )	0,003±0,01	0,002±0,01
Espermátides redondas (cm <sup>3</sup> )	0,12 ±0,01	0,13±0,01

Espermátides elongadas (cm <sup>3</sup> )	0,07±0,01	0,066±0,01
Espermatozoides (cm <sup>3</sup> )	0,04±0,01	0,03±0,01
Células de Sértoli (cm <sup>3</sup> )	0,064±0,01	0,072±0,01
Células de Leydig (cm <sup>3</sup> )	0,04±0,01	0,04±0,01
Compartimiento intertubular (cm <sup>3</sup> )	0,12±0,02	0,12±0,02
Membrana basal (cm <sup>3</sup> )	0,02±0,01	0,02±0,01
Lumen (cm <sup>3</sup> )	0,2±0,04	0,3±0,03
Detrito celular (cm <sup>3</sup> )	0,02±0,01	0,01±0,01
Proporción tubular-compartimiento intertubular	7,17±1,2	7,29±1,3
Largo tubular total (m)	38,73±10,5	32,66±6,2
Células de Sértoli por túbulo seminífero	27,7±1,8	27,7±1,8

**Foto 1.** Inmunomarcación positiva de las Células de Sértoli al anticuerpo antivimentina (flechas; 40x) de los túbulos seminíferos de los testículos derecho (a) e izquierdo (b) de los gatos de la **Tabla 1**.



## **Discusión**

A nuestro conocimiento este es el primer trabajo que describe el efecto de la hemicastración en el gato doméstico, sirviendo de base para estudios comparativos no solo con otros felinos sino también con otros mamíferos.

De acuerdo a los resultados biométricos y morfométricos obtenidos en este estudio, los gatos adultos, al igual que los ratones (6) y las ratas (7), no parecen desarrollar una hipertrofia compensatoria del testículo remanente después de la hemiorquiectomía.

Por otra parte, el peso testicular, el índice gonadosomático y el diámetro tubular en ambos grupos de testículos, fueron acordes con aquellos previamente reportados como normales para esta especie (13).

Las diferencias en la respuesta a la orquiectomía unilateral entre las diferentes especies podrían ser explicadas por el uso de diferentes diseños experimentales y edad de los animales en estudio. Finalmente, y de acuerdo a los resultados obtenidos, concluimos que en felinos adultos no existe hipertrofia compensatoria luego de la hemiorquiectomía y, por lo tanto, el modelo resulta de utilidad para nuestro próximo experimento.

## **Referencias**

- 1) Brown J, Schoenemann HM, Chakraborty PK. Pituitary and gonadal responses to hemicastration: A model for investigating the regulation of testicular function. *Current Trends in Exp Endocrinol* 1994;2:41-56.



- 2) Johnson BE. Effects of hemicastration on testicular function in adult and young puberal bulls. *Theriogenology* 1978;10:257-64.
- 3) Kittok RJ, Kinder JE, Johnson RK. Effect of castration on plasma luteinizing hormone concentrations in prepubertal boars. *J Anim Sci* 1984;58(5):1271-77.
- 4) Voglmayr JK and Mattner PE. Compensatory hypertrophy in the remaining testis following unilateral orchidectomy in the adult ram. *J Reprod Fertil* 1968;17:179-81.
- 5) Ott KM, Mannen KA, Dinger JE, Hoagland TA, Woody CO, Riesen SW. Effects of unilateral castration on the physiological and morphological characteristics of stallions' testes. *J Anim Sci* 1984; 59(1):355-56.
- 6) Fawke L, Moms A, Brown PS. Effects of hemicastration and the subsequent administration of drugs in the mouse. *J Reprod Fertil* 1972; 28:77-83.
- 7) Cunningham G, Tindall D, Huckins C, Means AR. Mechanisms for the testicular hypertrophy which follows hemicastration. *Endocrinol* 1978;102:16-23.
- 8) Putra DKH, Blackshaw AW. Morphometric studies of compensatory testicular hypertrophy in the rat after hemicastration. *Aust J Biol Sci* 1982;35:297-93.
- 9) Taha MB, Nooakes DE, Allen WE. Hemicastration and castration in the beagle dog; the effects on libido, peripheral plasma testosterone concentrations, seminal characteristics and testicular function. *J Small Anim Pract* 1982;23:219-85.
- 10) Gunzel-Apel AR, Heilkenbrinker T, Heilkenbrinker M, Messow D. Reproductive status of the dog after unilateral orchidectomy or unilateral abdominal testis reposition. *J Reprod Fertil* 1989;39:328-29
- 11) Boothe H. Testes and Epididymies. In: Slatter, D. (ed) *Textbook of Small Animal Surgery*, Saunders RW, Philadelphia, USA. 1993. pp 1331-1335

- 12) Lin CC, Huang WJ, Chen KK. Measurement of testicular volume in smaller testes: how accurate is conventional orchidometer? *Androl* 2009;30:685- 89.
- 13) Franca LR and Godinho C. Morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod* 2003;68:1554-61.

## CAPÍTULO III

### EFFECTOS DEL ANTAGONISTA DE GNRH, ACYLINE, SOBRE EL TESTÍCULO DEL GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*)

#### Introducción

Una normal función reproductiva depende de la liberación coordinada de las hormonas del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Niveles circulantes adecuados de las gonadotrofinas hipofisarias, LH y FSH, resultan esenciales para la proliferación y diferenciación del epitelio seminífero y la normal producción de esteroides gonadales (1).

En monos y humanos los antagonistas de GnRH han demostrado ser efectivos para suprimir la síntesis y secreción de LH y T (2,3). Estudios previos en humanos evidenciaron una profunda supresión de los niveles séricos de FSH y LH, e inhibición de la espermatogénesis que generó azoospermia u oligozoospermia severa en el 90% de los hombres en estudio (4,5). En monos, la inyección diaria durante 9 semanas de un antagonista de GnRH de segunda generación también indujo azoospermia (6). Aunque los efectos de la deprivación de andrógenos con antagonistas de GnRH de tercera generación sobre las características testiculares se han determinado en algunos mamíferos incluyendo el perro (7-9), los cambios macroscópicos e histológicos testiculares que ocurren después del tratamiento con antagonistas de GnRH no se han descrito en la especie felina. A partir de estos antecedentes desarrollamos un estudio con el objetivo de describir los efectos de una dosis única del antagonista de GnRH de larga

acción acyline sobre las características macroscópicas y microscópicas testiculares del gato doméstico.

## **Materiales y Métodos**

### *Animales*

En este estudio se incluyeron 12 gatos, reproductivamente normales, mestizos de 2 a 5 años y de 3,5 a 5 kg de peso, provenientes de propietarios que firmaron un consentimiento previo. Durante el experimento, todos los animales vivieron en el interior de sus casas, con acceso a patio abierto, se alimentaron con balanceado comercial y agua *ad libitum*. El día 0, se les administró el antagonista de GnRH acyline 330 µg/kg sc (NIH) a todos los gatos. La formulación, preparación y dosis del acyline coinciden con las explicadas en el Capítulo I. Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP (CICUAL, Número 129/09).

### *Cirugía y examen macroscópico de los testículos*

Se realizó anestesia general con xilacina (1-3 mg/kg im; Kensol®, Köing, Buenos Aires, Argentina) y ketamina (15-25 mg/kg; im Ketmin-50®; Holliday, Buenos Aires), complementando con lidocaína como anestésico local (0,5 ml máximo). Luego de las cirugías se inyectó ketoprofeno (Ketofen®, Fort Dodge; 1 mg/kg sc) una vez, y luego se continuó

administrando la misma droga por vía oral cada 24 horas durante 4 días. Las hemioquiectomías se realizaron a través incisión escrotal (10). Los animales se orquiectomizaron unilateralmente (testículo derecho) ya sea en el día -7 (n=7) ó día 15 (n=5). La hemiorquiectomía izquierda se llevó a cabo el día 15 (n=2), día 30 (n=4) ó día 60 (n=6; **Tabla 1**).

Inmediatamente después de la extirpación quirúrgica, los testículos se midieron [largo (cm) y ancho (cm)] usando un calibre y se pesaron (g). Se recuperaron los espermatozoides de la cola del epidídimo mediante sección con hoja de bisturí y recolección del exudado sobre un portaobjetos de vidrio atemperado (11; **Anexo, fotos 4 y 5**). También se calcularon el volumen testicular (cm<sup>3</sup>; 12) y el índice gonadosomático (%; 13).

**Tabla 1:** Cronograma quirúrgico de las orquiectomías unilaterales.

OD= Orquiectomía derecha; OI = Orquiectomía izquierda; ACY= acyline (330 µg/kg sc)

Gato	Dia -7	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 60
1	OD	ACY	OI		
2	OD	ACY	OI		
3	OD	ACY		OI	
4	OD	ACY		OI	
5	OD	ACY			OI
6	OD	ACY			OI
7	OD	ACY			OI
8		ACY	OD	OI	
9		ACY	OD	OI	
10		ACY	OD		OI
11		ACY	OD		OI
12		ACY	OD		OI

### *Evaluación de los espermatozoides epididimales*

El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva se evaluó subjetivamente y se clasificó de acuerdo a su vigor como progresiva muy rápida [5], progresiva rápida [4], progresiva normal [3], motilidad lenta [2], movimiento local [1], o no motiles [0]. Se observó la morfología espermática a través del extendido de una gota de semen sobre un portaobjetos. La misma se dejó secar y luego se tiñó con la tinción de Giemsa, observándose más de 100 espermatozoides con un objetivo de 100x (**Anexo, fotos 6 y 7**). Se determinó el porcentaje de espermatozoides con anomalías de cabeza, pieza intermedia y cola (14).

### *Evaluación histológica*

Los testículos se procesaron para su evaluación histológica e inmunohistoquímica de la misma manera que la descrita en el Capítulo II.

En 15 a 20 túbulos seminíferos por testículo se midieron el diámetro tubular máximo, mínimo y medio ( $\mu\text{m}$ ), eje mayor y menor ( $\mu\text{m}$ ), área ( $\mu\text{m}^2$ ) y perímetro ( $\mu\text{m}$ ) a 10x por planimetría (Image Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA). Con el mismo método también se registró la altura del epitelio germinal ( $\mu\text{m}$ ). El volumen ( $\text{cm}^3$ ) de los componentes testiculares se determinó por microscopía de luz usando una grilla de 441 puntos sobre las fotografías a 40x (**Anexo, fig. 3**). Para ello se seleccionaron 15 campos al azar (6615 puntos) para cada testículo. Los puntos se clasificaron de la siguiente forma: espermatogonias, espermátocitos primarios, espermátocitos secundarios, espermátides redondas, espermátides elongadas, espermatozoides, células de Sertoli, células de Leydig, compartimento

intertubular, membrana basal, lumen, detrito celular, y proporción tubular-compartimiento intertubular. También se calculó la longitud total de los túbulos seminíferos (metro; 13). Las células de Sertoli se contaron en 20 secciones tubulares para cada testículo.

### *Análisis estadístico*

Los parámetros testiculares se compararon entre los días por un ANOVA de una vía, seguido por el test de comparaciones de Tukey. Los resultados se expresaron como media±SEM, y el nivel de significancia se estableció en  $P < 0,05$  (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

### **Resultados**

Aunque las características testiculares macroscópicas parecieron no afectarse por el antagonista de GnRH (**Tabla 2**), el epitelio germinal y los espermatozoides epididimales sí lo hicieron. La espermatogénesis se vio alterada hasta el día 15, retornando a los valores pre tratamiento hacia el final del estudio (**Foto 1**). Las alteraciones histológicas más evidentes en el momento de máximo efecto del antagonista fueron la disminución de la altura del epitelio germinativo y la reducción del número de espermatoцитos primarios, espermátides redondas, espermátides elongadas y espermatozoides en los túbulos seminíferos, así como también el aumento de células muertas y restos celulares en el lumen tubular. Tanto las células de Sertoli (**Foto 2**), como las de Leydig no se vieron alteradas por el tratamiento (**Tabla 3**). La motilidad de los espermatozoides siguió el mismo patrón de modificación a lo largo de los

días del estudio alcanzando su punto más bajo el día 15, y las anormalidades morfológicas espermáticas aumentaron hacia el final del periodo experimental (**Tabla 4**). Las anormalidades más frecuentes fueron las gotas distales, las colas flexionadas y enrolladas y la microcefalia en menor proporción.

**Tabla 2.** Datos biométricos y morfométricos de 12 gatos a los que se les administró 330µg/kg de acyline el día 0. Las orquiectomías unilaterales se llevaron a cabo el día -7 (n=7) ó el día 15 (n=5) y el día 15 (n=2), día 30 (n=4) ó día 60 (n=6) para el testículo derecho e izquierdo, respectivamente.

<b>Parámetro</b>	<b>Día -7</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 30</b>	<b>Día 60</b>	<b>P</b>
Largo testicular (cm)	1,95±0,0	1,97±0,0	1,80±0,1	1,90±0,0	>0,1
Ancho testicular (cm)	1,04±0,03	1,05±0,02	1±0,07	1±0,06	>0,1
Peso testicular (g)	1,91±0,10	2,12±0,11	1,97±0,11	2,44±0,15	>0,05
Volumen testicular (cm <sup>3</sup> )	0,95±0,08	1±0,06	0,79±0,17	1,02±0,1	>0,1
Índice gonadosomático (%)	0,03±0,001	0,04±0,003	0,04±0,002	0,05±0,005	>0,1



**Tabla 3.** Parámetros histológicos de los testículos de 12 gatos a los que se les administró 330 $\mu$ g/kg de acyline el día 0. Las letras superíndices iguales en una misma línea indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los días.

Parámetro	Día -7	Día 15	Día 30	Día 60	P
Diámetro tubular máximo ( $\mu$ m)	219,69 $\pm$ 9,6	233,11 $\pm$ 12,6	238,59 $\pm$ 10,6	254,53 $\pm$ 8,4	>0,1
Diámetro tubular mínimo ( $\mu$ m)	159,22 $\pm$ 4,7	161,01 $\pm$ 11,1	175,42 $\pm$ 9,4	171,98 $\pm$ 7,5	>0,1
Diámetro tubular medio ( $\mu$ m)	186,34 $\pm$ 5,2	198,07 $\pm$ 7,7	204,03 $\pm$ 5,8	210,44 $\pm$ 5,7	>0,05
Eje tubular mayor ( $\mu$ m)	219,86 $\pm$ 12,4	237,66 $\pm$ 7,3	244,23 $\pm$ 8,1	237,36 $\pm$ 9,1	>0,1
Eje tubular menor ( $\mu$ m)	172,6 $\pm$ 6,9	165,59 $\pm$ 9,3	172,93 $\pm$ 5,7	183,72 $\pm$ 2,8	>0,1
Area tubular ( $\mu$ m <sup>2</sup> )	29724 $\pm$ 1873,3	30622 $\pm$ 2527,1	32983 $\pm$ 2083,4	34992 $\pm$ 1865,2	>0,1
Perímetro tubular ( $\mu$ m)	620,11 $\pm$ 19,7	660,51 $\pm$ 24,4	647,69 $\pm$ 33,5	690,77 $\pm$ 14,1	>0,1
Altura del epitelio germinal ( $\mu$ m)	50,15 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	35,56 $\pm$ 1,0 <sup>ab</sup>	40,33 $\pm$ 3,7	48,23 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>	<0,01
Espermatogonias (cm <sup>3</sup> )	0,054 $\pm$ 0,0	0,05 $\pm$ 0,0	0,04 $\pm$ 0,0	0,06 $\pm$ 0,0	>0,1
Espermatocitos primarios (cm <sup>3</sup> )	0,12 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,0 <sup>ab</sup>	0,07 $\pm$ 0,0 <sup>c</sup>	0,15 $\pm$ 0,0 <sup>bc</sup>	<0,01
Espermatocitos secundarios (cm <sup>3</sup> )	0,003 $\pm$ 0,0	0,001 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,002 $\pm$ 0,0	0,007 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	<0,05

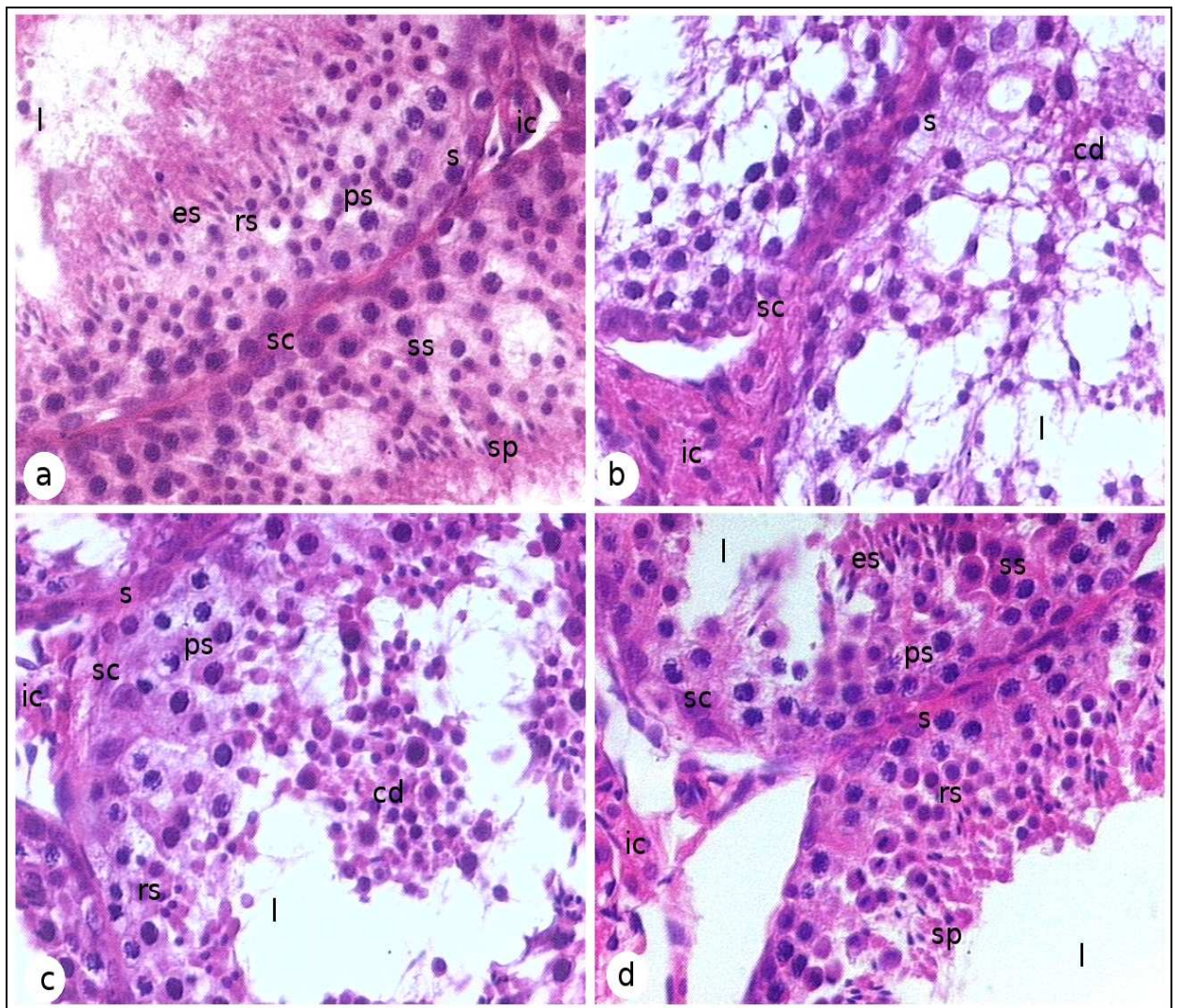
Espermátides redondas (cm <sup>3</sup> )	12,89±1,2 <sup>ab</sup>	2,08±0,4 <sup>ac</sup>	3,59±0,8 <sup>bd</sup>	10,96±1,4 <sup>cd</sup>	<0,01
Espermátides elongadas (cm <sup>3</sup> )	0,07±0,0 <sup>ab</sup>	0,01±0,0 <sup>ac</sup>	0,01±0,0 <sup>bd</sup>	0,05±0,0 <sup>cd</sup>	<0,01
Espermatozoides (cm <sup>3</sup> )	0,04±0,0 <sup>a</sup>	0,003±0,0 <sup>a</sup>	0,002±0,0 <sup>a</sup>	0,03±0,0	<0,05
Células de Sértoli (cm <sup>3</sup> )	0,07±0,0	0,07±0,0	0,06±0,0	0,08±0,0	>0,1
Células de Leydig (cm <sup>3</sup> )	0,06±0,0	0,04±0,0	0,03±0,0	0,08±0,0	>0,1
Compartimiento intertubular (cm <sup>3</sup> )	0,14±0,0	0,11±0,0	0,09±0,0	0,14±0,0	>0,1
Membrana basal (cm <sup>3</sup> )	0,02±0,0	0,04±0,0	0,05±0,0	0,04±0,0	>0,05
Lumen (cm <sup>3</sup> )	0,28±0,0 <sup>a</sup>	0,42±0,0 <sup>ab</sup>	0,26±0,0 <sup>b</sup>	0,31±0,0	<0,05
Detrito celular (cm <sup>3</sup> )	0,01±0,0 <sup>a</sup>	0,23±0,0 <sup>ab</sup>	0,15±0,0 <sup>ac</sup>	0,04±0,0 <sup>bc</sup>	<0,01
Proporción tubular- intertubular	6,18±0,5	9,71±1,9	7,85±0,2	6,58±0,8	>0,1
Largo tubular total (m)	7,49±0,7	7,45±0,7	5,55±1,5	6,44±0,7	>0,1
Células de Sértoli por túbulo	28,35±1,1	27,87±0,8	28,82±1,7	27,38±1,1	>0,1

---

**Tabla 4.** Características de los espermatozoides epididimales de 12 gatos a los que se les administró 330 $\mu$ g/kg de acyline el día 0. Las letras superíndices iguales en una misma línea indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los días.

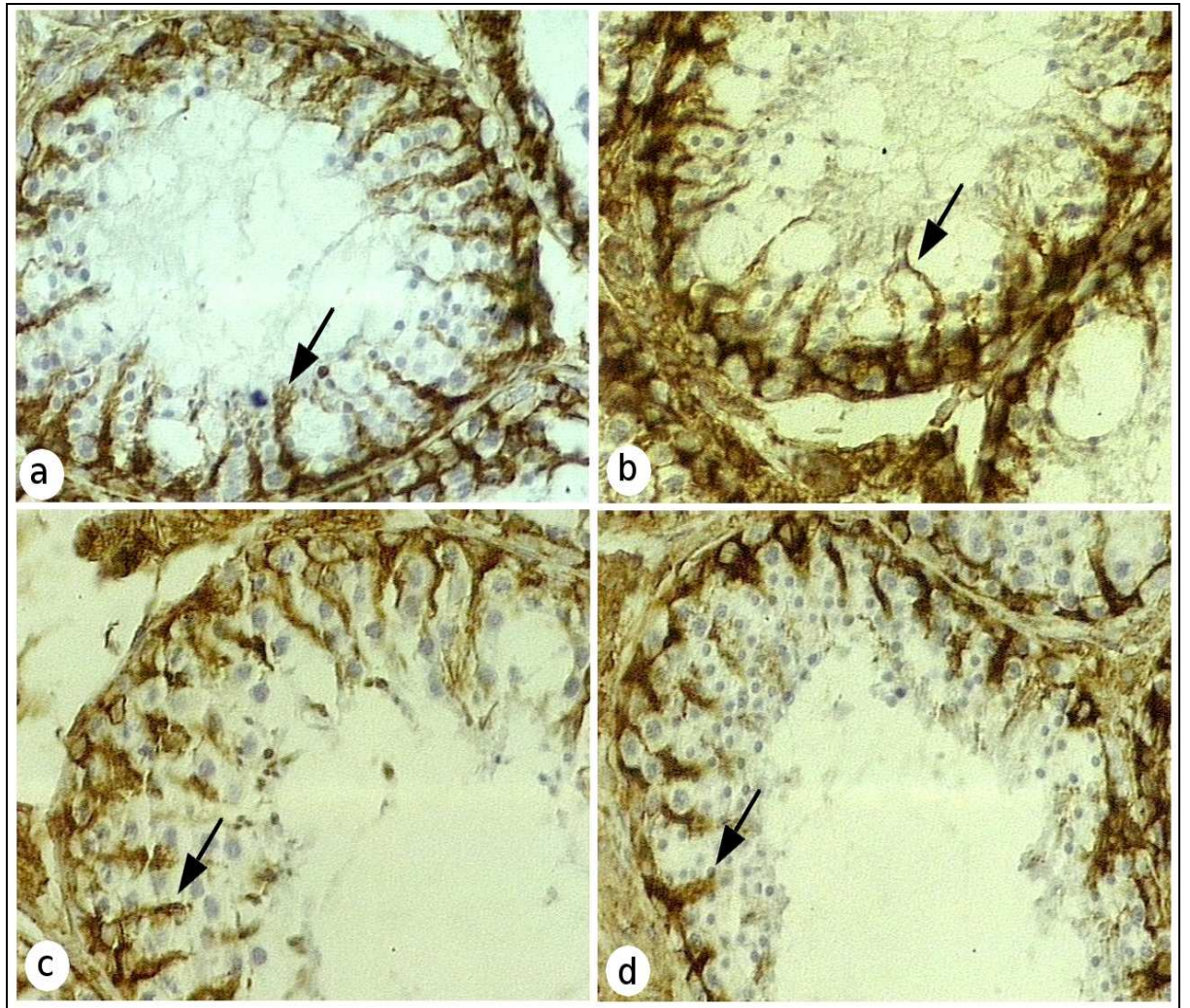
<b>Parámetro</b>	<b>Día -7</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 30</b>	<b>Día 60</b>	<b>P</b>
Motilidad espermática (%)	81,42 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	22,85 $\pm$ 4,4 <sup>ab</sup>	53,75 $\pm$ 13,5 <sup>a</sup>	67,5 $\pm$ 5,12 <sup>b</sup>	<0,01
Vigor (0-5)	4,42 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	2,85 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	3,25 $\pm$ 0,2	4 $\pm$ 0,2	<0,01
Morfoanomalías de cabeza (%)	1,14 $\pm$ 0,7	3,71 $\pm$ 0,5	5,25 $\pm$ 1,7	3,66 $\pm$ 1,1	=0,05
Morfoanomalías de pieza intermedia (%)	0,57 $\pm$ 0,2	1,14 $\pm$ 0,5	1 $\pm$ 0,4	0,33 $\pm$ 0,2	>0,1
Morfoanomalías de cola (%)	7,14 $\pm$ 1,7	18,71 $\pm$ 2,8	12,75 $\pm$ 1,4	20,16 $\pm$ 5,5	<0,05

**Foto 1.** Epitelio seminífero al día -7 (a), día 15 (b), día 30 (c), y día 60 (d) de los mismos animales y experimento de la Tabla 1. Espermatogonias (s), espermatocitos primarios (ps), espermatocitos secundarios (ss), espermátides redondas (rs), espermátides elongadas (es), espermatozoides (sp), células de Sértoli (sc), compartimiento intertubular (ic), lumen (l), detrito celular (cd; hematoxilina y eosina, 40x).





**Foto 2.** Inmunomarcación positiva de las células de Sertoli al anticuerpo antivimentina (flechas; 40x) al día -7 (a), día 15 (b), día 30 (c) y día 60 (d) de los túbulos seminíferos de los gatos y experimento de la Tabla 1.



## Discusión

Está bien establecido que los antagonistas de GnRH bloquean competitivamente los receptores de GnRH en la hipófisis anterior ejerciendo un efecto inhibitorio inmediato sobre el eje gonadal (15). Esta inhibición causa una disminución de los andrógenos circulantes resultando en una marcada reducción del tamaño y peso testicular (8,9,16). A diferencia de lo descrito en otras especies, no pudimos detectar una reducción en estos órganos, probablemente debido al pequeño tamaño de los testículos del gato, y al corto tiempo de privación de andrógenos que probablemente cause la aplicación de una única dosis del antagonista.

A pesar de que utilizamos una sola dosis de acyline, los efectos histológicos testiculares se ajustaron a los descriptos para monos y ratas andrógeno-privados por medio de antagonistas de GnRH (17,18). El desarrollo de las células germinales se detuvo a nivel de las espermatogonias, este estadio celular es el principal sitio de interrupción de la espermatogénesis por supresión de las gonadotrofinas en el hombre (19). A partir de ese nivel celular hacia la luz, hubo una disminución significativa de todos los componentes del epitelio germinal hasta el día 15 cuando retornaron progresivamente a los valores pre tratamiento hacia el final del estudio. También, en concordancia con estudios previos realizados con antagonistas de GnRH (20,21), las células de Sértoli y de Leydig permanecieron sin cambios a lo largo del periodo experimental. En concordancia con nuestra observación en felinos, Smithwick y Young (2001; 8), encontraron en chimpancés, la presencia de células muertas en el lumen tubular y la persistencia de las características normales del tejido intersticial.

Es bien sabido que el epidídimo es un órgano andrógeno-dependiente en el cual los espermatozoides maduran y adquieren motilidad (22). Este hecho explica claramente el

deterioro en el vigor y la motilidad ocurrido en el momento de mayor privación de andrógenos. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos con el mismo antagonista, donde la motilidad de los espermatozoides en el eyaculado canino disminuyó significativamente 14 días después del tratamiento (9). En nuestro estudio, la motilidad de los espermatozoides epididimales se vio deteriorada después del día 14, indicando una alteración en la espermatocitogénesis. En el estudio previamente mencionado en perros (9), las anomalías morfológicas espermáticas también ocurrieron 14 días después del tratamiento con acyline.

Los presentes resultados reflejan probablemente la supresión de la testosterona a concentraciones basales (similares a las de animales castrados) por dos semanas descriptos para un único tratamiento con acyline en otras especies (23,24).

La reversibilidad de los efectos adversos seminales que se describieron previamente para los antagonistas de GnRH (6) pudo demostrarse también en este estudio breve, donde la espermatogénesis recuperó los valores pre tratamiento hacia el final del experimento en coincidencia con la finalización de un ciclo espermático (13).

Se concluye que una única dosis del antagonista de GnRH de larga acción acyline, interrumpió la espermatocitogénesis y espermiogénesis, y alteró severamente la calidad espermática de manera reversible por dos semanas en gatos adultos. Una dosis superior o administraciones seriadas de este potente antagonista permitirían lograr una situación sostenida de privación andrógena que podría ser útil para fines clínicos o contraceptivos en la especie.

## Referencias

- 1) Shupnik MA, Schreihof DA. Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. *J. Androl.* 1997,18(4):341-344.
- 2) Weinbauer G, Nieschlag E. Comparison of the antigonadotropic activity of three GnRH antagonists (Nal-Glu, Antide and Cetrorelix) in a non-human primate model (*Macaca fascicularis*). *Androl.* 1993, 25:141-147.
- 3) Behre H, Bockers A, Schlingheider A, Nieschlag E. Sustained suppression of serum LH, FSH and testosterone and increase of high-density lipoprotein cholesterol by daily injections of the GnRH antagonist Cetrorelix over 6 days in normal men. *Clin. Endocrinol.* 1994, 40:241-248.
- 4) Pavlou SN, Debold CR, Island DP. Single subcutaneous doses of a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist suppress serum gonadotropin and testosterone levels in normal men. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 1986, 63:303–308.
- 5) Pavlou SN, Wakefield GB, Island DP. Suppression of pituitarygonadal function by a potent new luteinizing hormone-releasing hormone antagonist in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987, 64:931–936
- 6) Weinbauer GF, Surmann FJ, Akhtar FB, Shah GV, Vickery BH, Nieschlag E. Reversible inhibition of testicular function by a gonadotropin hormone-releasing hormone antagonist in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Fert. Steril.* 1984, 42(6):906-914
- 7) Pinski J, Yano T, Szepeshazi K, Groot K, Schally AV. Recovery of pituitary-gonadal induced by a single injection of microcapsules of LH-RH antagonist Cetrorelix (SB-75). *J. Androl.* 1993, 14:164-169.



- 8) Smithwick EB, Young LG. Effects of androgen deprivation on the histology of adult chimpanzee testis. *Tissue Cell* 2001a, 33(3):262-272.
- 9) Valiente C, Corrada Y, de la Sota PE, Galassi Gerez P, Gobello C. Effect of the GnRH antagonist, acyline, on canine testicular characteristics. *Theriogenology* 2007, 68(5):687-692.
- 10) Boothe H. Testes and Epididymies. In: Slatter, D. (ed) *Textbook of Small Animal Surgery*, Saunders RW, Philadelphia, USA. 1993, pp 1331-1335.
- 11) Soler AJ, Estes MC, Fernández-Santos MR, Garde JJ. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 degrees C in the epididymis for several days. *Theriogenology* 2005, 64(7):1503-1517.
- 12) Lin CC, Huang WJ, Chen KK. Measurement of testicular volume in smaller testes: how accurate is conventional orchidometer? *Androl.* 2009;30:685- 89.
- 13) Franca LR, Godinho C. Morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol. Reprod.* 2003, 68:1554-1561.
- 14) Axné E, Linde-Forsberg C, Einarsson S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology* 1999, 52(5):767-778.
- 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, 216:420-421.
- 16) Aslam H, Rosiepen G, Krishnamurthy H, Arslan M, Clemen G, Nieschlag E, Weinbauer GF. The cycle duration of the seminiferous epithelium remains unaltered

- during GnRH antagonist-induced testicular involution in rats and monkeys. *J. Endocrinol.* 1999, 161(2):281-288.
- 17) Zhengwei Y, Wreford NG, Schlatt S, Weinbauer GF, Nieschlag E, McLachlan RI. Acute and specific impairment of spermatogonial development by GnRH antagonist-induced gonadotrophin withdrawal in the adult macaque (*Macaca fascicularis*). *J. Reprod. Fertil.* 1998, 112:139-147.
- 18) Misro MM, Ganguly A, Das RP. Adverse effects of chronic GnRH antagonist administration on seminiferous epithelium in adult rats. *Arch. Androl.* 1992, 29(1):69-78.
- 19) Garrett C, Liu DY, McLachlan RI, Baker HWG. Time course of changes in sperm morphometry and semen variables during testosterone-induced suppression of human spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 2005, 20(11):3091-3100.
- 20) Sinha-Hikim AP, Swerdloff RS. Temporal and stage-specific changes in spermatogenesis of rat after gonadotropin deprivation by a potent gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology.* 1993, 133:2161-2170.
- 21) Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJ. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology.* 1995, 136:5-12.
- 22) Smithwick EB, Young LG. Histological effects of androgen deprivation on the adult chimpanzee epididymis. *Tissue Cell* 2001b, 33(5):450-461.
- 23) Herbst KL, Coviello AD, Page S, Amory JK, Anawalt BD, Bremner WJ. A single dose of the potent gonadotropin-releasing hormone antagonist acyline suppresses gonadotropins and testosterone for 2 weeks in healthy young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004, 89:5959–5965.

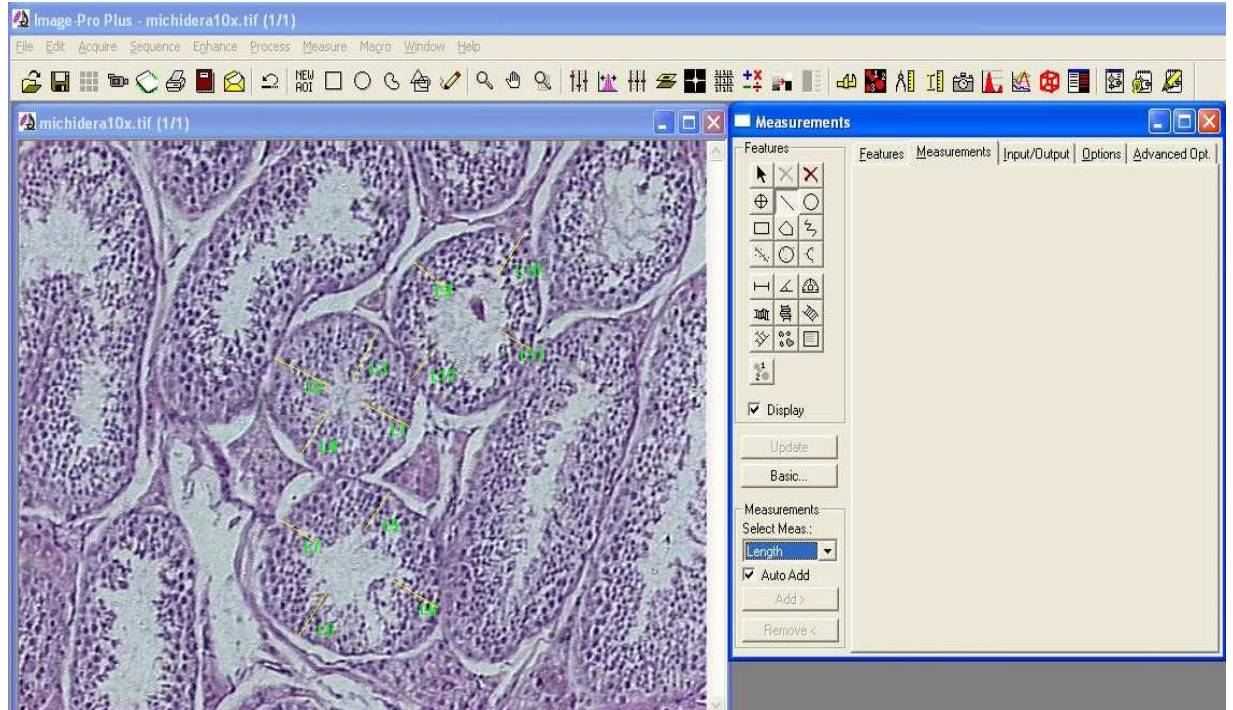
- 24) García Romero G, Valiente C, Aquilano D, Corrada Y, Gobello C. Endocrine effects of the GnRH antagonist, acyline, in domestic dogs. *Theriogenology* 2009, 71:1234–1237.

## CONCLUSIONES FINALES

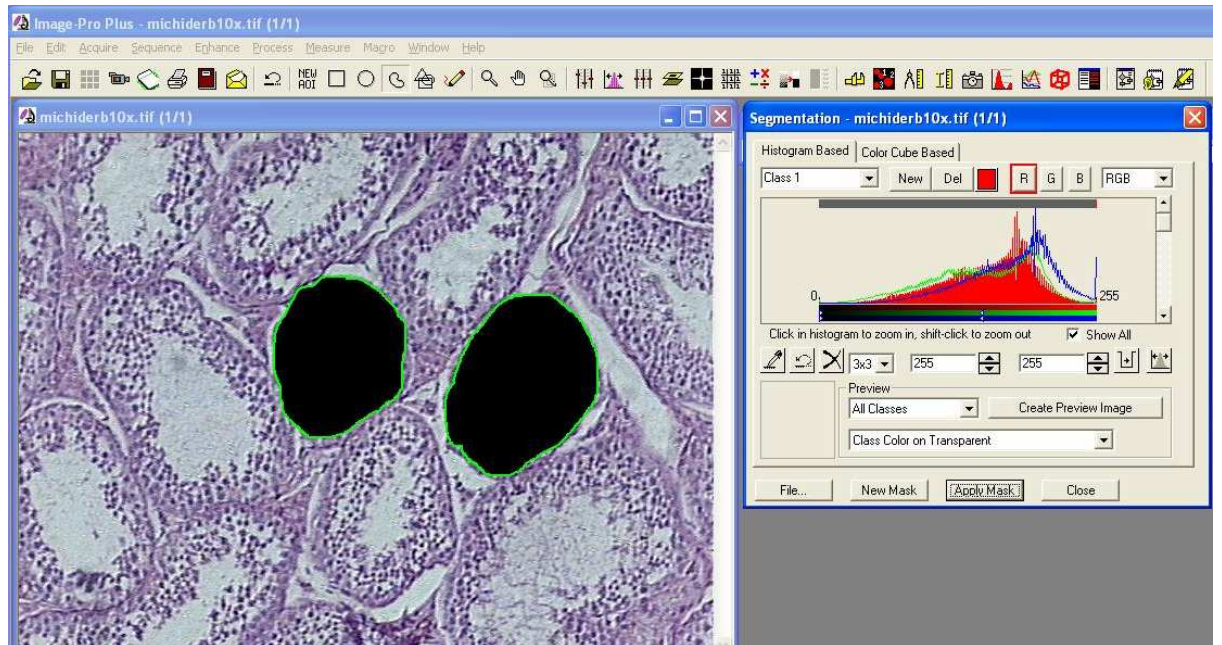
- ❖ Una única dosis del antagonista de GnRH acyline, disminuyó las concentraciones séricas de FSH, LH y T por debajo de los niveles basales en perros machos durante nueve días pos administración, e impidió la respuesta del eje gonadal a la estimulación con GnRH exógena por catorce días.
- ❖ De acuerdo a los datos morfométricos obtenidos, los gatos adultos no parecen desarrollar hipertrofia compensatoria del testículo remanente después de la hemiorquiectomía. Por lo tanto, el modelo resulta válido para el estudio y la generación de nuevas drogas contraceptivas en la especie.
- ❖ Una única dosis del antagonista de GnRH acyline, interrumpió la espermiogénesis, espermatocitogénesis y alteró severamente la calidad espermática de manera reversible por dos semanas en gatos adultos. La falta de soporte hormonal hallada en el Capítulo I justifica el deterioro de los parámetros mencionados.
- ❖ Es importante remarcar que ninguno de los animales de los tres experimentos presentó efectos colaterales locales ni sistémicos clínicos relacionados con los tratamientos.
- ❖ El presente trabajo de Tesis contribuye a la comprensión del mecanismo de acción de los antagonistas de GnRH de tercera generación en los caninos y felinos domésticos. De acuerdo a los resultados endocrinológicos, macroscópicos y microscópicos

testiculares obtenidos, sumado a la ausencia de efectos colaterales, los antagonistas se vislumbran como opciones farmacológicas no esteroideas efectivas y seguras para el manejo de reproductivo (contracepción, biotecnología y tratamiento de enfermedades hormonodependientes) en los pequeños animales. Resta aun profundizar el conocimiento sobre la farmacocinética de estos compuestos en las pequeñas especies. Además, surge la necesidad de desarrollar protocolos de administración que aseguren un efecto a largo plazo hasta tanto se desarrollen formulaciones de depósito de los antagonistas de GnRH.

## **ANEXOS**

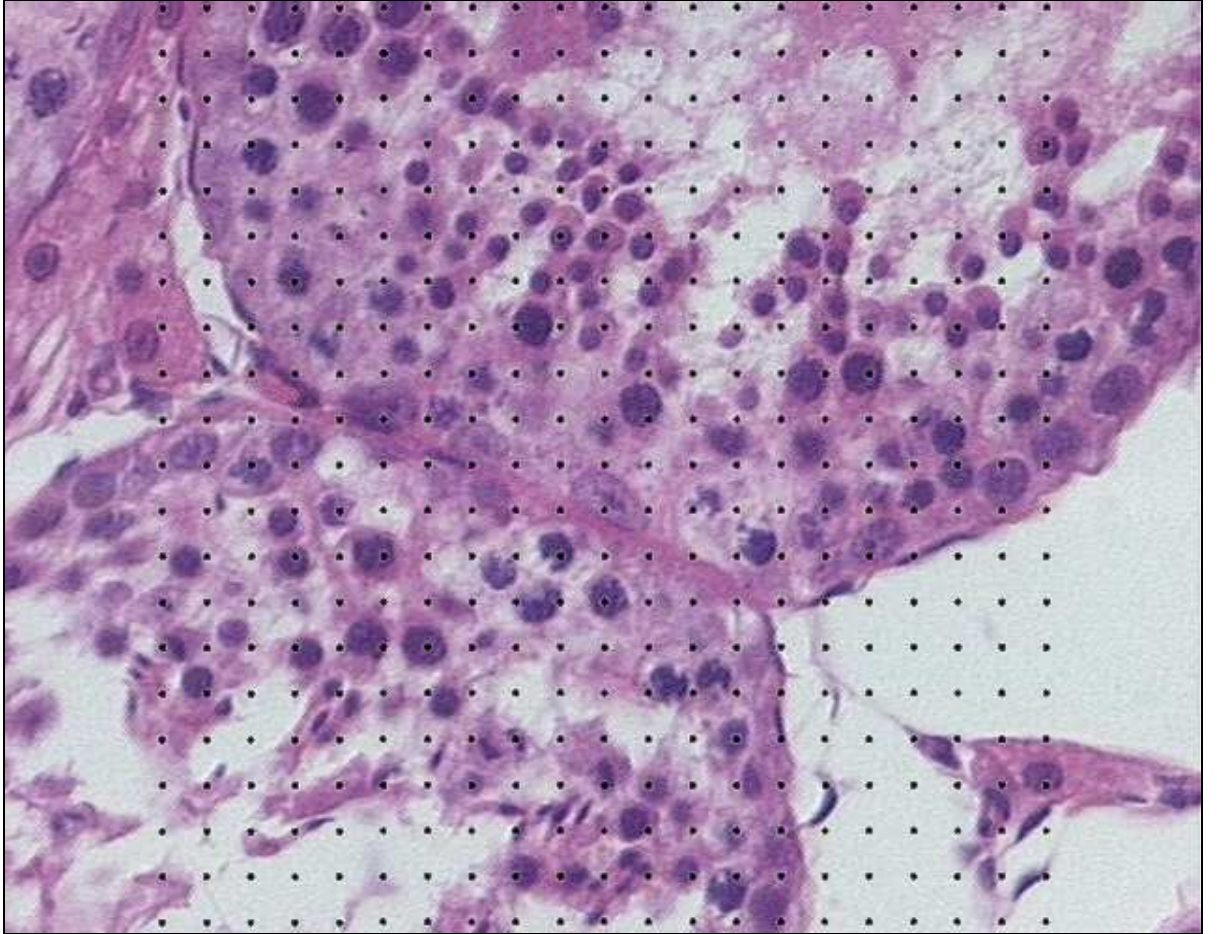


**Foto 1.** Medición de la altura del epitelio germinal por planimetría (Image Pro Plus, USA) en túbulos seminíferos de un corte histológico de testículo de un gato adulto teñido con hematoxilina y eosina (10x).



**Foto 2.** Medición del área, perímetro y ejes en túbulos seminíferos de un corte histológico de testículo de un gato adulto teñido con hematoxilina y eosina realizado con la misma técnica que la foto 1 (10x).



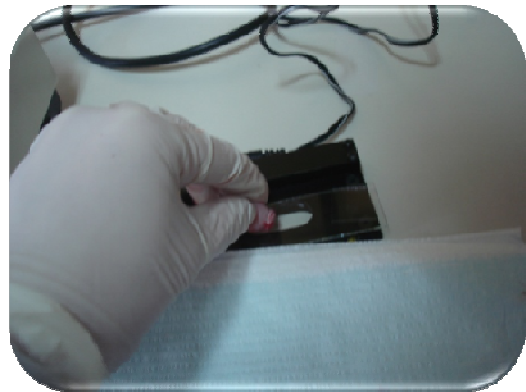


**Foto 3.** Conteo de células con la técnica de estereología en dos túbulos seminíferos de un corte histológico de testículo de gato teñido con hematoxilina y eosina (40x).





**Foto 4**



**Foto 5**



**Foto 6**



**Foto 7**

**Foto 4.** Recuperación de espermatozoides epididimales por sección longitudinal de la cola del epidídimo de un testículo de gato adulto.

**Foto 5.** Impronta del material recuperado de la cola del epidídimo.

**Fotos 6 y 7.** Tinción de la impronta con solución de Giemsa para el reconocimiento de morfoanomalías espermáticas.