

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



**EFFECTO DEL FOTOPERIODO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA
SOBRE LA PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA EN EL GATO DOMÉSTICO
(*FELIS SILVESTRIS CATUS*)**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Autor: MV, Romina Nuñez Favre

Director: MV, Dr. Cs. Vet. María Alejandra Stornelli

Lugar de Trabajo: Laboratorio y Servicio de Teriogenología.
Cátedra de Reproducción Animal. FCV. UNLP.

Miembros del Jurado: MV, Dr. Cs. Vet. Eduardo Aisen, Facultad de Ciencias
Agrarias. Universidad Nacional del Comahue.
MV, Dr. Cs. Vet. Humberto Cisale, Facultad de Ciencias
Veterinarias. Universidad de Buenos Aires.
MV, Dr. Cs. Vet. Alicia Flamini, Facultad de Ciencias
Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

La Plata, 22 de Marzo de 2013

*A toda mi familia, especialmente a mi esposo Gastón y a mis hijos Agus y Juani por la
paciencia y los momentos robados durante la realización de esta tesis.*

AGRADECIMIENTOS

El mayor de mis agradecimientos es para mi directora de tesis, la Dra. Alejandra Stornelli, por haber confiado en mí desde el primer momento, por haberme brindado su experiencia y afecto. Por recibirme en su grupo de trabajo y abrirme las puertas a la investigación científica. Sus sugerencias y correcciones han mejorado enormemente este trabajo.

Al Jefe Supremo, Dr. Luzbel de la Sota, quiero agradecerle la confianza y paciencia que me tuvo, también por compartir su experiencia científica y por haberme guiado siempre, dándome seguridad en el camino de la investigación. Sus sugerencias en cada uno de los experimentos han contribuido a mejorar este trabajo, a pesar de necesitar siempre “más muestras”. También quiero agradecerle por las correcciones de edición propuestas para este manuscrito.

Al Dr. Ángel Russo quién fue uno de mis maestros en Reproducción Animal y es un ejemplo de dedicación a la docencia y continuo aprendizaje.

Al Dr. Juan Carlos Reyna por iniciarme en la observación histológica y la identificación de las células testiculares.

A mi Co-equiper, la MV. Candela Bonaura, sin la cual no hubiera sido posible tomar las muestras seminales de los experimentos II y III. A la MV. Lorena Migliorisi, por ayudarme con las determinaciones hormonales, entre otras cosas.

A todos y cada uno de los integrantes de la Cátedra, que me recibieron con los brazos abiertos. En especial quiero agradecer la colaboración de la Dra. Cecilia Stornelli y Vanina Madoz; y a los MV, Claudia Tittarelli, Carla García Mitacek, Verano Gomez, María Jaureguiberry y Jessica Vlek por su compañerismo, por los mates y porque me han dado una mano en incontables ocasiones. También quiero agradecerles a los MV.

Isaías Mayorana, Magdalena Etchepare y Romina Praderio por cuidar con cariño a la colonia felina.

Al Laboratorio de Inmunoparasitología, de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por facilitarme su microscopio de fluorescencia y otros equipos, sin los cuales no hubiera podido desarrollar completamente mis experimentos.

A la Cátedra de Histología de la Facultad de Ciencias Veterinarias por su valiosa colaboración en el procesamiento de las muestras histológicas.

Al Dr. Goya y a Yolanda, por permitirme utilizar el Laboratorio de Endocrinología de la Facultad de Ciencias Médicas de La Plata para la realización y lectura de los RIA.

A los veterinarios de los Centros de Zoonosis de Alte. Brown, Ringuelet y La Plata por su colaboración en la realización del experimento I.

Al laboratorio Syntex, en especial al Dr. Videla Dorna, por su colaboración en el desarrollo de los estudios de la influencia de la melatonina sobre el desarrollo espermático en el gato doméstico.

A Royal Cannin por su colaboración que nos permitió implantar en la colonia felina un plan nutricional adecuado para los gatos en estudio, sin el cual el desarrollo de los experimentos no se hubiera ajustado a las normas CIOMS.

A la UNLP por haberme permitido realizar mis estudios de grado y posgrado.

Al CONICET por haberme becado para poder dedicarme a realizar la tesis.

A los jurados por sus minuciosas correcciones en tiempo récord y sus valiosos aportes que me han dado la oportunidad de mejorar este trabajo.

Por último, quisiera agradecer a mi esposo Gastón que ha sido mi guía y mi sostén en esta etapa, a mis hijos, Agustín y Juan por iluminarme día a día y a toda mi familia que son mi apoyo incondicional.

Muchas Gracias....

ÍNDICE

	Página
LISTA DE PUBLICACIONES.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
RESUMEN	XII
SUMMARY	XIII

CAPÍTULOS

I. ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA

Introducción.....	1
Estacionalidad en Pequeños Rumiantes.....	4
Estacionalidad en Roedores	10
Estacionalidad en Felinos.....	11

II. ESTUDIO DE LAS VARIACIONES ESTACIONALES TESTICULARES Y DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EPIDIDIMAL EN RELACIÓN CON LAS VARIACIONES NATURALES DEL FOTOPERIODO

Introducción.....	17
Objetivos	18
Hipótesis.....	18
Materiales y Métodos	19
Diseño experimental	19
Procesamiento y toma de muestras.....	19
Análisis Estadístico.....	24

Marco bioético del uso de animales.....	25
Resultados.....	25
Discusión y Conclusión	28
III. REFRACTARIEDAD AL ESTÍMULO LUMÍNICO	
Introducción.....	32
Objetivos	33
Hipótesis.....	34
Materiales y Métodos	34
Diseño experimental	34
Régimen Lumínico	34
Toma de muestras y evaluación de semen	35
Análisis Estadístico.....	37
Marco bioético del uso de animales.....	37
Resultados	37
Discusión y Conclusión	38
IV. EFICACIA FARMACOLÓGICA DE IMPLANTES DE MELATONINA	
Introducción.....	43
Objetivos	45
Hipótesis.....	46
Materiales y Método	46
Diseño experimental	46
Análisis Estadístico.....	48
Marco bioético del uso de animales.....	48

Resultados	48
Discusión y Conclusión	50
V. CONCLUSIONES GENERALES	54
VI. BIBLIOGRAFÍA	55
VII. BIOGRAFÍA PERSONAL	64

LISTA DE PUBLICACIONES

TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS PERIÓDICAS

- 1) **Núñez Favre R**, Bonaura MC, Tittarelli CM, Mansilla-Hermann D, de la Sota RL, Stornelli MA. (2012) Effect of natural photoperiod on epididymal sperm quality and testosterone serum concentration in domestic cat (*Felis silvestris catus*). *Reproduction in Domestic Animals*. 47 Suppl. 6:232-234. ISSN 0936-6768
- 2) **Núñez Favre R**, Bonaura MC, Tittarelli CM, Stornelli MC, de la Sota RL, Stornelli MA. (2012) Effect of refractoriness to long photoperiod on sperm production and quality in tomcats. *Reproduction in Domestic Animals*. 47 Suppl. 6:235-237. ISSN 0936-6768

TRABAJOS PUBLICADOS EN CONGRESOS

- 1) **Núñez Favre R**, Stornelli MA, Stornelli MC, García Mitacek MC, Savignone CA, Bonaura MC, Fumagali F, de la Sota RL. (2009) Evaluación morfológica de espermatozoides recuperados de epidídimo en el gato doméstico (*Felis catus*). VII Congreso Nacional de la Sociedad Uruguaya de Veterinarios Especialistas en Pequeños Animales (SUVEPA). Congreso Nacional AUVE. Montevideo, Uruguay.
- 2) **Núñez Favre R**, Savignone CA, Tittarelli CM, de la Sota RL, Stornelli MA. (2010) Estacionalidad reproductiva en el gato doméstico. XIX Jornadas Veterinaria en Pequeños Animales, Jornadas de Intermédica. Buenos Aires. CD de la Jornada.

- 3) **Nuñez Favre R**, Stornelli MA, Savignone CA, Stornelli MC, Tittarelli CM, García Mitacek MC, de la Sota RL. (2010) Effect of natural photoperiod on epididymal spermatozoa quality in domestic cat. Annual Conference of Society for Theriogenology (SFT) and American College of Theriogenologists (ACT). Clinical Theriogenology. The official Journal of the Society for Theriogenology. The American College of Theriogenologists. 2(3) pp 353. ISSN: 2154-3968.
- 4) **Nuñez Favre R**, Bonaura MC, Tittarelli CM, Mansilla Hermann D, de la Sota RL, Stornelli MA. (2012) Effect of natural photoperiod on epididymal sperm quality and testosterone serum concentration in domestic cat (*Felis silvestris catus*). 7th International Symposium on canine and feline reproduction. Whistler, British Columbia, Canada. Libro de abstracts pp 184-185.
- 5) **Nuñez Favre R**, Bonaura MC, Tittarelli CM, Savignone C, García Mitacek C, Stornelli MC, Mansilla Hermann D, de la Sota RL, Stornelli MA (2010). Parámetros seminales en gatos mantenidos bajo régimen de luz artificial. XII Congreso de ciencias Morfológicas y 9 jornadas de educación. Libro de resúmenes del congreso. pp. 99.
- 6) **Nuñez Favre R**, Bonaura MC, Praderio R, de la Sota RL, Rojas Samora CA, Stornelli MA (2011). Ocurrencia de anormalidades espermáticas en el gato doméstico (*Felis catus*). I Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal. Viña del mar. Chile. Resúmenes del Simposio.
- 7) **Nuñez Favre R**, Bonaura MC, Tittarelli CM, Stornelli MC, de la Sota RL, Stornelli MA. (2012) Effect of refractoriness to long photoperiod on sperm production and quality in tomcats. Whistler, British Columbia, Canada. Libro de abstracts pp 186-187.

LISTA DE ABREVIATURAS

AI	acrosomas intactos
AL	ascenso lumínico
CC	células principales claras
CE	concentración espermática
CO	células principales oscuras
CON	controles
d	día
DC	días cortos
DIC	diacetato de carboxifluoresceína
DL	descenso lumínico
DL	días largos
FSH	hormona folículo estimulante
GnRH	hormona gonadotrófica
h	hora
IM	integridad de membrana
LH	hormona luteinizante
LHRH	hormona liberadora de gonadotrofina
ME	morfología espermática
MEL	melatonina
MI	motilidad individual
PAS	ácido periódico Schiff
PLA	placebo
PRL	prolactina
PV	porcentaje de vivos
RIA	radioinmunoanálisis
T	testosterona
TRT	tratados
V	voltios
VI	vigor
W	watts
YP	yoduro de propideo

LISTA DE FIGURAS

Figura

2.1. Fotomicrografía de diferentes cortes histológicos de testículos de gatos. Túbulos seminíferos en estadios I y II y células intersticiales	21
2.2. Fotomicrografía de diferentes cortes histológicos de testículos de gatos. Túbulos seminíferos en estadios III y IV y células intersticiales	22
2.3. Variaciones estacionales de la morfología espermática, la integridad de membrana plasmática, la motilidad y la cantidad de espermatozoides totales de gatos castrados en ascenso y descenso lumínico	27
2.4. Variaciones en la cantidad de espermátides maduras en gatos castrados en diferentes estaciones	27
2.5. Variaciones estacionales en las células de Sértoli y Leydig en gatos castrados en ascenso y en descenso lumínico.....	28
3.1. Manejo lumínico aplicado para evaluar la refractariedad lumínica sobre la calidad seminal	35
3.2. Diseño experimental propuesto para evaluar la refractariedad lumínica sobre la calidad seminal	36
3.3. Cambios evidenciados en la motilidad, el vigor, el porcentaje de espermatozoides vivos, el volumen seminal, la concentración espermática y la cantidad de espermatozoides totales en gatos mantenidos con diferentes variaciones lumínicas.....	39
3.4. Cambios evidenciados en el porcentaje de acrosomas intactos, el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra, el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y la concentración de T sérica en gatos mantenidos con diferentes variaciones lumínicas	40

- 4.1. Variaciones en la motilidad, el vigor, la cantidad de espermatozoides totales y el porcentaje de espermatozoides vivos en gatos controles y con implante de melatonina 49
- 4.2. Variaciones en el porcentaje de acrosomas intactos, el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra, la cantidad de espermatozoides morfológicamente normales y la concentración de testosterona sérica en gatos controles y con implante de melatonina..... 50

RESUMEN

EFECTO DEL FOTOPERIODO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE LA PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA EN EL GATO DOMÉSTICO (*FELIS SILVESTRIS CATUS*)

En el felino doméstico, la estacionalidad ovulatoria y estral de la hembra ocurre durante los días que presentan más de 12 h luz. Sin embargo, la estacionalidad reproductiva del gato ha sido definida recientemente. El objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto del fotoperiodo natural, el manejo lumínico artificial y la administración de melatonina sobre la producción espermática en el gato doméstico. En el primer estudio se evaluó el efecto del fotoperiodo natural sobre la morfología testicular y la calidad espermática epididimal. Se observó que la producción espermática se mantiene constante a través del año, evidenciándose una mayor cantidad de túbulos seminíferos con estadios avanzados de maduración y una mayor cantidad de células de Leydig y Sertoli en correspondencia con una mejor calidad espermática epididimal, durante AL, sin embargo estas variaciones fotoperiodicas no se encuentran reflejadas en la concentración de T sérica. En el segundo experimento se estudió el efecto del manejo lumínico artificial sobre la producción espermática, observándose que el gato doméstico presenta un efecto de fotorefractariedad al fotoperiodo largo, el cual produce una disminución en todos los parámetros seminales evaluados, efecto que puede revertirse sometiendo a los gatos a fotoperiodo corto, para luego cambiarlos a fotoperiodo largo y recuperar la calidad seminal observada antes de la refractariedad. En el tercer experimento se evaluó la eficacia farmacológica de implantes de melatonina en gatos para suprimir la espermatogénesis. Un implante de melatonina de 18mg, logra disminuir la calidad seminal durante 90-100d, llegando a valores semejantes a los hallados en d de fotoperiodo corto, sin que se manifiesten efectos colaterales adversos. La calidad seminal se recupera aproximadamente 250d después de colocado el implante. En conclusión, nuestros resultados demostraron que el gato posee una producción espermática estacional en relación al fotoperiodo, la cual se ve afectada por la concentración de melatonina sérica y el fenómeno de fotorefractariedad.

PALABRAS CLAVE: Estacionalidad reproductiva, Fotorefractariedad, Anticoncepción, Implantes de Melatonina.

SUMMARY

EFFECT OF NATURAL PHOTOPERIOD AND MELATONIN ADMINISTRATION ON SPERM
PRODUCTION IN THE DOMESTIC CAT (*FELIS SILVESTRIS CATUS*)

The queen is a seasonal breeder when exposed to natural photoperiod, with ovarian activity during increasing photoperiod. However, seasonality in tom cats has been recently defined. The aim of this study was to assess the effect of natural and artificial photoperiod and melatonin administration on sperm production in the domestic cat (*Felis silvestris catus*). In the first experiment we studied seminal epithelium morphology, epididymal sperm characteristics and serum T concentration in cats under natural photoperiod. Our results show a constant sperm production throughout the year, with a higher percentage of seminiferous tubules with mature sperm and more Leydig and Sertoli cells corresponding with a better epididymal sperm quality during increasing light. However natural photoperiod induces no changes on serum T concentrations. In the second experiment, the effect of artificial photoperiod was studied. We observed that refractoriness and reduced sperm production and sperm quality induced by a prolonged long photoperiod can be restored after placing tomcats to a short photoperiod. In the third experiment we study the efficacy of a subcutaneous melatonin implant to suppress sperm production in the tom cat. A subcutaneous MEL implant effectively, reversibly, and safely reduced sperm production for 90 to 100d in cats. Seminal characteristics during treatment were similar to that observed during short photoperiod. Seminal quality was restored approximately 250d after implant insertion.

In conclusion, our results demonstrate that photoperiod induces seasonal changes in spermatozoa quality. This seasonality is affected by serum melatonin concentrations and photorefractoriness.

KEYWORDS: Seasonality, Photorefractoriness, Contraception, melatonin implants.

CAPITULO I

ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA

INTRODUCCIÓN

A través de años de evolución, los mamíferos se han adaptado a vivir en casi cualquier hábitat. Los diferentes hábitats están sometidos, en mayor o menor medida, a fluctuaciones climáticas y variaciones en las h de luz diaria, las cuales son más pronunciadas a medida que aumenta la latitud. Los mamíferos que habitan regiones con diferencias marcadas en la cantidad de h luz diarias a lo largo del año, se adaptaron a estas modificaciones lumínicas exhibiendo cambios cíclicos en su fisiología y comportamiento reproductivo. De esta forma, el cambio adaptativo principal resulta en restringir la actividad reproductiva al momento del año en el cual es posible cubrir las demandas energéticas más altas (fines de la gestación, parto, lactancia y destete). Es así, que la etapa reproductiva es coincidente con la mayor disponibilidad de alimento para asegurar la sobrevivencia de la cría. En zonas templadas, las mencionadas condiciones medioambientales ocurren en primavera y principios de verano. En tanto, en regiones tropicales y áridas estas condiciones se asocian principalmente a la temporada de lluvias (Bronson, 1989; Martín y col., 1994; Malpoux, 2006). Por otra parte, existe también un factor social, dado por el estímulo táctil, señales visuales, auditivas y olfativas a través de feromonas, que influyen sobre el estado reproductivo en ovinos, bovinos, roedores y cerdos (Vandenbergh, 1976; Kirkwood y col., 1981; O'Callaghan y col., 1994; Rekwot y col., 2001). En ovinos, estas señales sexuales están dadas por la interacción entre machos y hembras. Las hembras al estimularse entre sí logran inducir ciclos estrales y adelantar el inicio de la temporada reproductiva. Los machos producen un estímulo

visual y olfativo sobre las hembras que, a través de feromonas, inducen ovulación de hembras en anestro tardío; así como también, retrasan el final de la temporada reproductiva. A su vez, las hembras inducen un aumento en el volumen testicular, la secreción de las glándulas anexas y los niveles de testosterona sobre los machos (O'Callaghan y col., 1994).

La manera en que cada animal interactúa con estos factores depende, de la especie, de su genética individual y de su estado reproductivo en ese momento específico. La influencia de los factores ambientales sobre la regulación de la actividad sexual de mamíferos ha sido ampliamente estudiada. Actualmente se sabe que la estacionalidad reproductiva en especies que habitan zonas templadas, está regida principalmente por el fotoperiodo, es decir, por la variación en la cantidad de luz diarias a través del año. La variación en la duración de los días, es uno de los factores más importantes en la regulación de la estacionalidad reproductiva debido a que se mantiene constante de un año a otro, siendo así altamente previsible, a diferencia de otros factores climáticos como la temperatura y las lluvias, que presentan mayores variaciones anuales (Thiery y col., 2002). Es así, que los animales presentan periodos de actividad sexual seguidos por periodos de reposo, de duración e intensidad variable regulados ambos por el fotoperiodo (Chemineau y col., 1996; Malpoux y col., 1996).

La manera en que los animales sincronizan la actividad reproductiva en un momento específico del año comienza a estudiarse a principios de siglo, a partir del interrogante de los anatomistas acerca de la relación entre glándula pituitaria y las gónadas. Con el paso del tiempo, se creó una subdisciplina orientada a estudiar los patrones regulatorios encefálicos. Las primeras descripciones de sustancias endocrinas neurales que regulan la actividad reproductiva datan de la década del 40 y fueron realizadas en ratas domésticas. A partir de ese momento, el estudio sobre este tópico se

extendió a otras especies y esta subdisciplina se transformó en una especialidad, la endocrinología reproductiva que, en un principio, fue orientada hacia patrones bioquímicos y luego moleculares (Bronson, 1989)

Actualmente, el conocimiento en esta área es inmenso. Es así que se ha comprobado que el mecanismo por el cual el fotoperiodo regula la actividad reproductiva en animales de zonas templadas, se encuentra relacionado estrechamente con la actividad de la glándula pineal y de su producto de secreción. De esta forma la cantidad de h luz diaria es captada a nivel ocular y transformada al ciclo diario de secreción de melatonina por la glándula pineal. La secreción nocturna de esta hormona refleja la duración de la noche, regulando así la secreción pulsátil de GnRH desde el hipotálamo. Así mismo, las variaciones en la secreción de GnRH inducen variaciones en la secreción de hormona LH responsable de la presencia o ausencia de ovulación en la hembra, y de variaciones en la producción espermática en el macho (Malpaux y col., 1999). Debido a que la melatonina no se almacena en la glándula pineal, la concentración sérica refleja fielmente su síntesis y liberación las cuales a su vez, están fuertemente ligadas al ciclo luz/oscuridad (Chemineau y col., 1996; Malpaux y col., 1997). Un cambio en la duración del tiempo de liberación de melatonina durante la noche, relacionado con la estación del año, estimula o frena el pulso de GnRH, la cual activa o suprime la liberación de LH y FSH hipofisarias, según la especie sea fotoperiódica positiva o negativa (Leyva y col., 1989; Vieyetz, 1995; Malpaux y col., 1999; Claustrat y col., 2005). La estimulación o inhibición en la liberación de gonadotrofinas está, a su vez, regulada por un mecanismo de retroalimentación negativo con sus productos finales de secreción (inhibina y testosterona).

ESTACIONALIDAD EN PEQUEÑOS RUMIANTES

El efecto del fotoperiodo sobre la funcionalidad reproductiva se halla bien documentada en pequeños rumiantes que habitan zonas templadas. En estos animales las variaciones fotoperiódicas son el factor medioambiental principal para regular la actividad reproductiva. El factor genético también es importante debido que determina la sensibilidad a las variaciones fotoperiódicas, en tanto que, la temperatura y la disponibilidad alimentaria desempeñan un papel secundario y son considerados como moduladores de la actividad reproductiva (Aisen, 2004). Sin embargo, en zonas tropicales con variaciones fotoperiódicas mínimas, las ovejas presentan un ritmo endógeno que alterna períodos de actividad sexual y quiescencia no sincronizado entre animales ni con el calendario anual. De esta manera, el rol principal del fotoperiodo en condiciones naturales sería el de sincronizar el ritmo endógeno de los ciclos estrales (Robinson y Karsch, 1988; Karsch y col., 1989; Malpaux y col., 1997). En términos generales, en regiones templadas las ovejas domésticas comienzan a ciclar a mediados del verano, cuando los días se están acortando y los ciclos culminan durante el invierno a medida que los días se alargan. Sin embargo, existen grandes variaciones entre razas, así como entre individuos de la misma raza, iniciando su temporada reproductiva antes o después, dependiendo de la duración del periodo de anestro. Así mismo, algunas razas exhiben ovulaciones silentes, sin relación con el ciclo anterior ni con el siguiente, durante el incremento en la duración de los días (Ortavant y col., 1988).

Durante la temporada reproductiva, los ciclos estrales ovinos se repetirán cada 17 d y, de no mediar gestación, estos ciclos se repetirán de forma continua hasta mediados del invierno, cuando la duración de la cantidad de h luz diaria comienza a aumentar. En este momento, los ciclos ovulatorios cesan y los animales se mantienen en anestro durante los d que presentan mayor cantidad de h luz (d largos). Esta estacionalidad es

regida por la acción de melatonina, estimulando la pulsatilidad de la hormona GnRH durante las noches largas de la temporada reproductiva (Gomez-Brunet y col., 2008). Si bien el pico de concentración sérica de melatonina no varía a lo largo del año, sí lo hace la duración de las noches y debido a que la melatonina se sintetiza sólo en los periodos de oscuridad, se encontrará en concentraciones elevadas durante más tiempo durante estaciones del año con noches más largas. Por esta razón, otros autores han evidenciado una mayor duración de los niveles altos de melatonina cuando los animales se encuentran en estro y una menor en los periodos de anestro (Rollag y col., 1978).

En esta especie, el periodo de acortamiento así como el de alargamiento de la cantidad de h luz diaria son importantes para situar, en el momento del año adecuado, la temporada reproductiva del año siguiente. Es así que el incremento de la cantidad de h luz diaria es fundamental para el mantenimiento de la gestación y la producción láctea. Así como también se ha observado que influye sobre el tamaño de corderos mellizos (Ortavant y col., 1988; Barrell y col., 2000). De esta forma, el alargamiento de la cantidad de h luz diaria que se produce entre los solsticios de invierno y verano, juegan un papel fundamental para la ocurrencia de la temporada reproductiva del otoño siguiente (Malpoux y col., 1989). En tanto que los d largos cercanos al solsticio de verano son necesarios para suprimir la actividad reproductiva, el acortamiento de la cantidad de h luz desde el solsticio de verano hasta el equinoccio de otoño, es responsable de la duración y de la intensidad de la temporada reproductiva próxima. Por último, los días que presentan menor cantidad de h luz (d cortos) presentes desde el equinoccio de otoño hasta el solsticio de invierno, sincronizan la temporada reproductiva del año siguiente (Wayne y col., 1990; Gomez-Brunet y col., 2008). De esta forma los cambios fotoperiódicos estacionales actuales, sincronizan el ritmo endógeno reproductivo de la temporada siguiente.

Si bien los machos acompañan la estacionalidad reproductiva observada en la hembra, la sensibilidad que estos presentan al fotoperiodo es diferente, manifestando cambios reproductivos 1,5 a 2 meses antes que la hembra (Ortavant y col., 1988). Estos cambios, tanto fisiológicos como conductuales, se deben a la acción de gonadotrofinas circulantes. Durante el alargamiento de la cantidad de h luz diaria los niveles de gonadotrofinas permanecen bajos induciendo una regresión en el tamaño testicular de hasta un 20% con la correspondiente reducción de la concentración de testosterona. El cambio a d cortos produce un aumento en la secreción de gonadotrofinas relacionado con el aumento en la duración de las noches, es así que el patrón de secreción diario se modifica, aumentando de uno a diez picos por día la secreción de gonadotrofinas. Como cada pico secretorio de LH induce posteriormente un pico secretorio de testosterona, esta última aumentará su concentración en conjunto con la mayor pulsatilidad de LH (Ortavant y col., 1988). Como consecuencia de estas modificaciones endocrinológicas, ocurre un aumento en el tamaño testicular, así como en la cantidad de espermatozoides presentes en el eyaculado, aproximadamente 2 a 3 semanas posteriores al cambio lumínico (Lincoln y col., 1977). Esta variación en el tamaño testicular se debe a un mayor número de espermatocitos primarios y espermátides durante los d largos previos al comienzo de la temporada reproductiva. Este hecho es seguido de un aumento del tamaño epididimal (Thibault y col., 1966). Así mismo, Thimonier comunicó un mayor tamaño de la vesículas seminales y una mayor concentración de fructosa en las mismas durante la época reproductiva (Thimonier, 1981). En concordancia con lo anteriormente expuesto, también se ha observado que tanto el número de montas como el volumen testicular, exhiben una clara estacionalidad, encontrando los máximos volúmenes testiculares durante los meses de invierno y los volúmenes mínimos durante los meses de verano (Lincoln y col., 1977; Avdi y col., 2004). Así mismo, se ha demostrado que la

calidad seminal y la capacidad fecundante de muestras seminales criopreservadas de otoño fueron mejores que las muestras de primavera al inseminar ovejas en diferentes estaciones (Ortavant y col., 1988).

Estos cambios endocrinológicos estacionales modifican la concentración de otras hormonas como la prolactina, evidenciándose una disminución de esta hormona concomitante con el paso de d largos a d cortos, al tiempo que los niveles de FSH, LH y posteriormente, testosterona se incrementan. La situación inversa se evidencia con el paso a d largos, en donde esta hormona es fundamental para el desarrollo mamario y la producción láctea (Langford y col., 1987; Pelletier y Almeida, 1987; Ortavant y col., 1988).

En los caprinos, las hembras presentan actividad sexual fuertemente estacional, ovulando cuando descienden las h luz (Chemineau y col., 2008). En concordancia con la estacionalidad de las hembras, los machos cabríos muestran una marcada estacionalidad reproductiva, ocurriendo actividad sexual durante el otoño. Si bien los machos de esta especie presentan espermatogénesis continua, ocurren modificaciones cuantitativas y cualitativas durante el año. La disminución de la espermatogénesis durante la estación de reposo sexual provoca cambios en el tamaño testicular, así como también disminución en la actividad de las glándulas accesorias (Delgadillo y col., 1991). Así mismo, la concentración de testosterona sérica varía durante el año alcanzando niveles máximos desde comienzos del otoño hasta finales de primavera (Delgadillo y col., 2004).

En ovinos y caprinos además de observarse estacionalidad en la actividad reproductiva también se ha evidenciado un fenómeno de insensibilidad al estímulo lumínico constante, denominado fotorefractariedad. El mismo, se manifiesta luego de mantener a los animales durante periodos prolongados a una cantidad fija de h luz

diaria. Es decir, que a pesar de que los d cortos estimulan la actividad reproductiva, un periodo prolongado de d cortos induce insensibilidad al estímulo lumínico con el consiguiente cese de la actividad reproductiva. Este fenómeno fotorefractario se observa en condiciones fisiológicas en las transiciones entre estro y anestro. De esta forma, al finalizar la temporada reproductiva, la oveja es insensible a la estimulación producida por los d cortos, de forma tal que la exposición de estos animales a periodos de d cortos no retrasará el inicio del anestro. De la misma forma, al inicio de la temporada reproductiva se evidencia refractariedad al estímulo producido por los d largos (Chemineau y col., 1992).

Por otro lado, si los animales son mantenidos durante un largo periodo de d largos la actividad sexual comienza de manera espontánea como una adaptación al estímulo lumínico constante (Howles y col., 1982). Este fenómeno fotorefractario puede ser evitado exponiendo a los animales a periodos alternados de d largos y cortos. Este manejo es esencial para el control fotoperiódico de la actividad sexual en animales mantenidos en ambientes controlados (Almeida y Lincoln, 1984; Chemineau y col., 1992). Al realizar cambios lumínicos cada 30 o 60 días, los animales responden siempre a la estimulación lumínica ambiental, manteniéndose la actividad reproductiva (Legan y Karsch, 1980; Delgadillo y col., 1993). Esta alternancia mensual entre d cortos y largos es usada en carneros y machos cabríos en centros de inseminación artificial, para inhibir el efecto fotorefractario, obteniendo semen durante todo el año sin variaciones en la calidad espermática ni en la fertilidad. Mediante este manejo lumínico se ha logrado mantener la calidad seminal por 3 años consecutivos (Delgadillo y col., 1993). A su vez, la generación de pulsos lumínicos durante las horas de oscuridad puede ser utilizada para mimetizar d largos y el tratamiento con melatonina para mimetizar d cortos (Chemineau y col., 1992). De esta forma, para el control reproductivo a contra-estación,

puede utilizarse efectivamente la sucesión de días largos seguido de descenso lumínico o días largos y administración de melatonina. De esta forma se logra adelantar la pubertad en carneros jóvenes y mejorar la calidad seminal. Así mismo, en carneros adultos, induce un aumento en el volumen testicular y una mejora de la calidad seminal durante los días largos de primavera (Chemineau y col., 1992). Similares resultados se observaron en machos cabríos, en los cuales el efecto del fotoperiodo largo fue bloqueado por la acción de melatonina exógena. Sin embargo, la utilización prolongada de esta hormona induce cambios cíclicos en la actividad testicular, semejantes a los cambios observados durante la exposición prolongada a días cortos (Lincoln y Ebling, 1985). En cabras, el tratamiento con melatonina luego de días largos, induce y mantiene los celos durante la primavera con altas tasas de fecundación (Chemineau y col., 1992). En ovejas, la administración de melatonina oral o en formulación de implantes adelanta de 2 a 8 semanas los ciclos estrales en animales mantenidos bajo régimen de días largos (Arendt y col., 1983).

Dentro del grupo de los pequeños rumiantes también los cérvidos presentan estacionalidad reproductiva influenciada por el fotoperiodo. Si bien existen muchas variaciones dentro de la familia cervidae, tomaremos como modelo al corzo (*Capreolus capreolus*). Esta especie, presenta una temporada reproductiva corta de tan solo un mes acompañada de importantes cambios en su aparato reproductivo relacionados con su marcada estacionalidad. La actividad reproductiva estacional se evidencia entre julio y agosto en Europa e induce cambios en el tamaño testicular y en las glándulas accesorias. El volumen del eyaculado, número total de espermatozoides, porcentaje de motilidad y de espermatozoides normales es marcadamente superior durante la temporada reproductiva en comparación con la temporada no reproductiva. La producción de espermatozoides normales y motiles se correlacionó tanto con el contenido proteico del

plasma seminal así como con la concentración de testosterona en el plasma seminal y suero, evidenciándose los máximos valores durante la temporada reproductiva (Goeritz y col., 2003). Schön y col encontraron que durante los meses de diciembre-enero (temporada no reproductiva), los túbulos seminíferos estaban conformados casi en su totalidad por células de Sertoli y espermatogonias, mientras que durante la temporada reproductiva las espermátides alcanzaron su número más alto y los túbulos seminíferos aumentaron su diámetro (Schon y col., 2004). Blottner y col. han descrito que el número de células intersticiales de Leydig se mantiene constante durante el año, variando solo su actividad, encontrándose el pico máximo de concentración de testosterona durante la temporada reproductiva (Roelants y col., 2002; Blottner y Schoen, 2005).

ESTACIONALIDAD EN ROEDORES

Los roedores también presentan estacionalidad reproductiva. Entre las especies fotoperiódicas positivas, el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) presenta actividad reproductiva durante los días largos de primavera-verano. El resto del año, mientras las hembras se mantienen en anestro, los machos permanecen en estado de quiescencia reproductiva con manifiesta regresión testicular, siendo incapaces de producir gametas. Este periodo de inactividad gonadal tiene una duración aproximada de 5 meses después de los cuales comienza a reactivarse la espermatogénesis, produciéndose aumento del tamaño testicular, mientras que en las hembras se reanudan los ciclos estrales (Stetson y col., 1983). Durante el periodo de días cortos la ausencia de ciclos estrales y la regresión testicular es inducida por un descenso de las hormonas LH, FSH y prolactina. Estos cambios endocrinológicos reproductivos fotoperiódicos se encuentran mediados por la acción de la melatonina (Stetson y Tate-Ostroff, 1981). El efecto de esta última hormona sobre la actividad reproductiva ha sido utilizada para inducir la regresión

gonadal en hámsters intactos y pinealectomizados, mantenidos bajo fotoperiodo estimuladorio (Stetson y Tate-Ostroff, 1981). Por otra parte, en esta especie también se ha observado una acción negativa del estímulo lumínico constante sobre la actividad reproductiva. Algunos animales evidencian reactivación gonadal espontánea con activación espermatogénica y de los ciclos estrales 10 a 12 semanas después de comenzado el periodo inhibitorio de d cortos. Esta reactivación gonadal se produce incluso en ausencia total de luz. Estos animales no solo no responden al estímulo lumínico inhibitor, sino que también son refractarios a la acción de melatonina exógena, ya sea en formulación de implantes o mediante inyecciones subcutáneas. Posiblemente esto se deba a insensibilidad por parte de los tejidos blanco para esta hormona. Esta refractariedad puede ser revertida exponiendo a los animales a un periodo de 11 semanas de d largos, luego de los cuales tanto los machos como las hembras, vuelven a ser sensibles nuevamente al fotoperiodo corto (Stetson y col., 1977; Stetson y Tate-Ostroff, 1981; Stetson y col., 1983)

ESTACIONALIDAD EN FELINOS

Los felinos domésticos (*Felis silvestris catus*) que habitan zonas templadas también presentan estacionalidad reproductiva. Desde hace más de 3 décadas la gata ha sido clasificada como fotoperiodica positiva. Los celos ocurren durante los d que presentan más de 12 h luz y se relacionan con bajas concentraciones séricas de melatonina. Durante la temporada reproductiva los celos se manifiestan de forma ininterrumpida cada 14 a 19 d de no mediar gestación, pseudopreñez o enfermedad (Johnston y col., 2001). Por el contrario, durante el invierno, cuando los d poseen menos de 8 h luz, la concentración sérica de melatonina aumenta, no se producen pulsos de GnRH y el eje hipofisario-gonadal está quiescente por lo que la actividad ovárica cesa y

la hembra comienza una etapa de anestro (Leyva y col., 1984; Leyva y col., 1989). Es así que puede inducirse el ciclo estral mediante el aumento artificial del fotoperiodo (Hurni, 1981). Las concentraciones plasmáticas de melatonina están sincronizadas con las concentraciones plasmáticas de prolactina. Por lo que ambas hormonas se encuentran elevadas durante el fotoperiodo corto y bajas durante el fotoperiodo largo, que corresponde a la estación reproductiva (Leyva y col., 1984; Versteegen, 1998).

Si bien la estacionalidad reproductiva se encuentra claramente definida en la hembra felina, en los machos existen pocos estudios sobre este tópico. Algunos trabajos han comunicado la ausencia de estacionalidad reproductiva en el gato (Spindler y Wildt, 1999; Franca y Godinho, 2003). Sin embargo, estudios más recientes sugieren una producción espermática estacional en machos felinos (Axner y Linde Forsberg, 2007; Blottner y Jewgenow, 2007; Stornelli, 2007).

De la misma forma que ocurre en otras especies fotoperiodicas, los felinos domésticos presentan espermatogénesis continua mostrando solo variaciones en los parámetros seminales a lo largo del año, siendo éste el principal efecto del fotoperiodo. Ya en la década del 80, Johnstone (1984) observó un aumento en el volumen seminal en eyaculados realizados durante la temporada reproductiva. Veinte años más tarde, estudios realizados en gatos domésticos, sugirieron estacionalidad reproductiva. En dichos trabajos se menciona que la cantidad y calidad de espermatozoides epididimales fue significativamente mayor en muestras provenientes de epidídimos de gatos castrados en d de más de 11 h luz (Stornelli y col., 2004; Tittarelli y col., 2004). En concordancia con estos resultados, Blottner observó que si bien en todas las estaciones se mantiene la capacidad de producir semen, existieron variaciones en el peso testicular y en la cantidad de espermatozoides por testículo en muestras de animales castrados durante la primavera, comparado con los estudiados en otoño-invierno. En este estudio

también se encontraron diferencias en la motilidad y el porcentaje de espermatozoides normales en las mismas estaciones estudiadas (Blottner y Jewgenow, 2007).

Un estudio retrospectivo sobre la morfología espermática realizado en Suecia, puso en evidencia que el porcentaje de espermatozoides normales en muestras seminales tomadas de gatos durante el ascenso lumínico fue mayor (Axner y Linde Forsberg, 2007). Similares resultados fueron descritos por Stornelli y col. (2009) quién demostró variaciones estacionales en el desarrollo de la hilera seminal en gatos adultos castrados durante diferentes épocas del año.

En la actualidad existe pocos datos sobre la producción espermática del gato doméstico y cuál sería la calidad seminal durante la época reproductiva de la hembra felina. Es así que aún no se han definido los parámetros seminales del espermograma normal. Algunos autores han encontrado alrededor de 40% de espermatozoides morfológicamente normales en gatos mestizos, mientras que otros sugieren que el porcentaje sería mayor al 60% (Wildt y col., 1983; Howard y col., 1990; Axner y Linde Forsberg, 2007). Sin embargo, existe gran variabilidad entre diferentes gatos, así como entre muestras del mismo animal cuando se utiliza electroeyaculación (Pineda y col., 1984; Zambelli y Cunto, 2006). Este hecho adquiere gran importancia al estimar los parámetros seminales normales para cada animal en particular. Se han sugerido al menos 5 evaluaciones para evaluar la fertilidad de un gato (Johnstone, 1984).

Las variaciones observadas en la calidad de los espermatozoides recuperados a lo largo del año, concuerdan con cambios histológicos testiculares. Se ha observado una mayor proporción de túbulos con espermátides con cola y espermatozoides en animales castrados en d con ascenso en la cantidad de h luz diaria en comparación con animales castrados en d con descenso en la cantidad de luz diaria. Así mismo en épocas con

descenso en la cantidad de luz diaria se encontró una mayor proporción de espermátides inmaduras (Stornelli y col., 2009).

Se ha demostrado que el epidídimo posee funciones relacionadas con la maduración y el almacenamiento espermático (Axner, 2006). Este órgano presenta un epitelio pseudoestratificado en el cual pueden observarse tres tipos celulares (células principales, apicales y basales). En el gato doméstico, las células principales se dividen en células claras y oscuras. Esta característica tintorial observada al microscopio óptico podría relacionarse con diferencias en la fisiología de cada tipo celular. En invierno, se ha evidenciado una menor proporción células oscuras y mayor de células claras, mientras que la situación inversa se observó durante los días de verano-otoño. Este hecho podría sugerir una mayor actividad celular epididimal, relacionada con la producción de factores implicados en la maduración espermática, en la etapa de mayor producción de espermatozoides (Reyna y col., 2008). Así mismo, se ha observado que los testículos de gatos que fueron castrados en los meses de primavera-verano, presentaron un mayor porcentaje de células PAS positivas. Este hallazgo se correlacionaría con una mayor actividad secretora del epidídimo en concordancia con la época de mayor producción espermática en el gato doméstico, mostrando una mayor producción de mucopolisacáridos en la estación del año con días largos (Savignone y col., 2007).

Como se mencionó anteriormente las variaciones fotoperiodicas se hallan en estrecha relación con la concentración sérica de MEL y determinan la estación reproductiva. La concentración de esta hormona es más baja durante los períodos de actividad ovárica (estro) que durante los períodos de inactividad (anestro, interestro Verstegen, 1998). Es así que la administración oral de MEL (20-30 mg/día) se ha utilizado para suprimir el desarrollo folicular en gatas expuestas a fotoperiodo largo (Leyva y col., 1989; Graham y col., 2004). Sin embargo, la administración de MEL no

bloquea la percepción de la luz, por lo que el aumento de la síntesis estrogénica relacionada con el desarrollo folicular ocurre inmediatamente después de finalizada la administración hormonal, a diferencia de los 45 días necesarios para estimular la actividad ovárica en las gatas controles bajo el mismo régimen lumínico (Leyva y col., 1989). Así mismo, la aplicación de un implante de MEL de 18 mg durante el interestro ha evitado la ocurrencia de celos durante 4 meses sin que se manifiesten efectos colaterales, permitiendo un control reversible y económico del ciclo estral en la gata doméstica (Gimenez y col., 2009). El uso de concentraciones mayores de MEL (implantes de 36 mg) no logró aumentar la duración del interestro post-implante (Stornelli y col., 2008).

Diversos estudios realizados durante más de 3 décadas demuestran la importancia del fotoperiodo y la acción de la melatonina sobre la actividad reproductiva de diferentes animales domésticos y silvestres. Así mismo, existe suficiente evidencia sobre el efecto del fotoperiodo sobre la estacionalidad reproductiva en felinos domésticos. Estas variaciones lumínicas son importantes no sólo en la gata sino también sobre los machos felinos. Estudios sobre la estructura testicular y la calidad de espermatozoides epididimales en relación al fotoperiodo natural permitirán definir mejor el rol de del fotoperiodo sobre la producción espermática en el gato doméstico. No se han realizado aun trabajos que estudien el efecto de la MEL sobre la producción espermática en el gato doméstico. Sin embargo, los estudios realizados sobre el efecto de MEL en la gata así como la relación existente entre las h luz y la producción espermática en el macho sugieren que la administración de MEL podría influir sobre el ciclo espermático en felinos. Es así que la aplicación de un implante de MEL que suprima la producción espermática en el gato doméstico sin efectos colaterales

permitiría un control reversible y económico de la reproducción en el gato que complementarían el control de la reproducción implementado en la hembra felina.

En virtud de lo anteriormente expuesto, los tres objetivos de esta tesis fueron: 1) estudiar las variaciones estacionales testiculares y de la calidad espermática epididimal en relación con las variaciones naturales del fotoperiodo (Capítulo II); 2) evaluar si la refractariedad a un fotoperiodo largo puede ser revertida sometiendo a los gatos a un fotoperiodo corto para luego cambiarlos a un fotoperiodo largo y de esta forma, recuperar la calidad seminal encontrada antes del periodo refractario (Capítulo III); y 3) Evaluar la eficacia farmacológica de implantes de melatonina en gatos para suprimir la espermatogénesis (Capítulo IV). Para cumplir con estos tres objetivos se realizaron tres experimentos que se describen en los capítulos siguientes.

CAPÍTULO II

ESTUDIO DE LAS VARIACIONES ESTACIONALES TESTICULARES Y DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EPIDIDIMAL EN RELACIÓN CON LAS VARIACIONES NATURALES DEL FOTOPERIODO

INTRODUCCIÓN

Las variaciones estacionales y la localización geográfica en la que se encuentran los animales modulan su actividad gonadal. Las hembras felinas de zonas templadas manifiestan actividad ovárica durante los meses de primavera y verano cuando los días presentan más de 12 h luz (temporada reproductiva). Si la gata está sana y no presenta preñez o pseudopreñez, los celos ocurren cada 14 a 19 d durante toda la temporada reproductiva. En contraposición durante la temporada no reproductiva, en relación a la disminución de las horas luz diarias, la actividad ovárica cesa y la hembra permanece en anestro (Johnston y col., 2001).

En los gatos machos la estacionalidad reproductiva no es tan manifiesta. El efecto del fotoperiodo sobre la espermatogénesis podría observarse a través de las variaciones en la calidad seminal. Este hecho fue sugerido a partir de estudios en los cuales la cantidad y calidad de espermatozoides epididimales obtenidos en muestras provenientes de epidídimos de gatos castrados en días de más de 11 h luz, fue significativamente mayor que la obtenida en muestras de animales castrados en días de menos de 11 h luz. (Stornelli y col., 2004; Tittarelli y col., 2004). En concordancia, Blottner observó que si bien en todas las estaciones el gato mantiene la capacidad de producir semen, existen variaciones en el peso testicular y en la cantidad de espermatozoides testiculares siendo

ambos parámetros mayores en animales castrados durante la primavera en comparación con los castrados en otoño-invierno. El mismo estudio reveló diferencias en la motilidad y el porcentaje de espermatozoides normales (Blottner y Jewgenow, 2007). Así mismo un estudio retrospectivo sobre morfología espermática realizado en Suecia, evidenció que el porcentaje de espermatozoides normales fue mayor en muestras seminales de gatos estudiados en la época del año en que ocurría ascenso lumínico (Axner y Linde Forsberg, 2007). En un estudio realizado a lo largo de un año, Stornelli y col. (2009), evidenciaron un mayor porcentaje de espermatides con cola, así como de espermátides maduras y una mayor cantidad de células de Leydig en animales castrados durante días largos en comparación con los castrados durante días cortos.

Los trabajos mencionados sugieren la ocurrencia de estacionalidad reproductiva en el gato doméstico así como ocurre en los machos de otras especies. Es así que para evidenciar el efecto que las variaciones lumínicas estacionales producen sobre la hilerá seminal se diseñó un experimento con el fin de estudiar el efecto del fotoperiodo natural sobre la producción espermática.

OBJETIVO

Estudiar las variaciones estacionales testiculares y de la calidad espermática epididimal en relación con las variaciones naturales del fotoperiodo.

HIPÓTESIS

El gato doméstico presenta variaciones anuales en la morfología testicular y en la calidad espermática epididimal regidas por las variaciones del fotoperiodo.

MATERIALES Y MÉTODO

Diseño experimental

Se utilizaron gatos (n=43) mestizos de pelo corto, clínicamente sanos, cuyas edades oscilaban entre 1 y 4 años de edad y tenían un peso entre 2 y 5 kg en un diseño completamente aleatorizado. Los gatos utilizados formaban parte de un plan de control urbano de la reproducción organizado por la Municipalidad de La Plata y Almirante Brown. Los animales incluidos en el experimento fueron castrados durante las últimas semanas de cada estación para evidenciar el efecto del fotoperiodo sobre la calidad espermática. Es así que se conformaron 4 grupos:

I: gatos castrados durante las dos primeras semanas de septiembre (invierno, fotoperiodo corto; menos de 12 h luz) (n= 12);

II: gatos castrados durante las dos primeras semanas de diciembre (primavera, fotoperiodo largo; mas de 12 h luz diarias) (n= 14);

III: gatos castrados durante las dos primeras semanas de marzo (verano, fotoperiodo largo; mas de 12 h luz diarias) (n= 9);

IV: gatos castrados durante las dos primeras semanas de junio (otoño, fotoperiodo corto; menos de 12 h luz diarias) (n= 8).

Procesamiento y toma de muestras

Los gatos fueron anestesiados con ketamina (25 mg/kg i.m.), xylazina (1mg/kg i.m.) y atropina (0,04 mg/kg i.m.) (Slatter, 1993); y sometidos a orquiectomía bilateral. El día de la cirugía y previo a la realización de la misma, se tomó una muestra de sangre para determinación de concentración de T sérica.

Inmediatamente después de finalizada la cirugía, cada par de testículos se colocó en un frasco con solución fisiológica atemperada a 37°C y fue transportado al laboratorio refrigerado a 15°C.

Luego de la identificación del testículo derecho e izquierdo los correspondientes epidídimos fueron separados y los testículos procesados por separado. Se seleccionó para el estudio el tercio anterior de cada testículo y se fijaron en solución de Bouin durante 2 horas. Las muestras testiculares fueron procesadas mediante la técnica de inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes de 3 μm de espesor con micrótopo de deslizamiento y se colorearon con Hematoxilina y Eosina. Las secciones testiculares así obtenidas se observaron bajo objetivo de inmersión (1000X), seleccionando para su estudio un total de 20 túbulos seminíferos cortados transversalmente por muestra. Los mismos se clasificaron de acuerdo al grado de maduración de las espermatídes en cuatro grados (Figura 2.1, Figura 2.2):

- I: túbulos con espermatídes redondeadas,
- II: túbulos con espermatídes elongadas,
- III: túbulos con espermatídes con cola,
- IV: túbulos con espermatozoides.

Se contaron además las células de Sertoli presentes en los mismos túbulos y las células intersticiales de Leydig observadas en los mismos campos microscópicos (Figura 2.2; Stornelli y col., 2009).

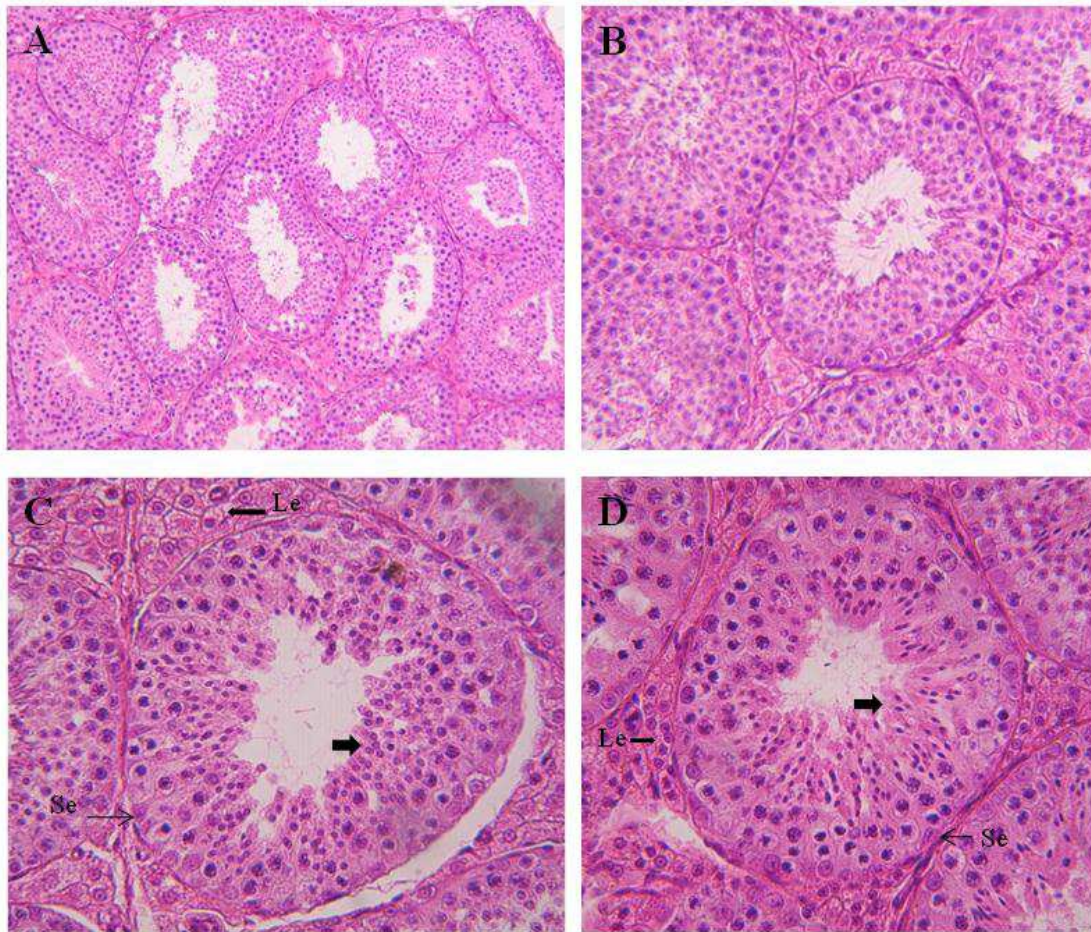


Figura 2.1. Fotomicrografía de diferentes cortes de testículos de gatos. A) Varios túbulos seminíferos en diferentes estadios del ciclo espermatogénico y tejido intersticial (10X), B) Túbulos seminíferos y tejido intersticial (20X). Nótese que el túbulo central contiene espermatozoides maduros listos para ser liberados, C) Túbulo seminífero grado I (40X), D) Túbulo seminífero grado II (40X). En el espacio intersticial pueden observarse las células de Leydig (Le) y sobre la membrana basal las células de Sertoli (Se).

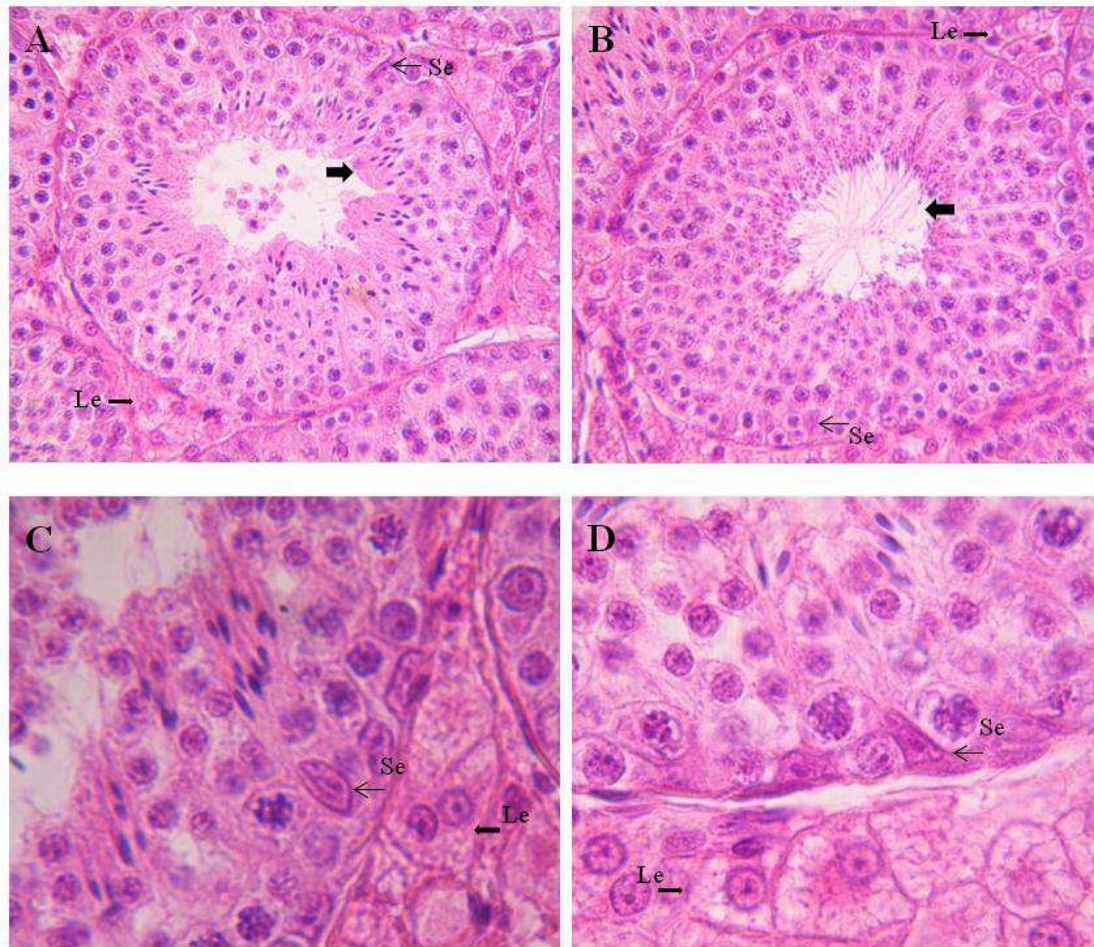


Figura 2.2. Fotomicrografía de diferentes cortes de testículos de gatos. A) Túbulo seminífero grado III (40X), B) Túbulo seminífero grado IV (40X). En el espacio intersticial pueden observarse las células de Leydig (Le) y sobre la membrana basal las células de Sertoli (Se). C) y D) Muestran con mayor detalle las células de Sertoli y Leydig (100X).

Con los epidídimos obtenidos se realizó la recuperación espermática de la cola del órgano mediante la técnica de cutting (Tittarelli y col., 2006). Para ello, cada cola se colocó en un tubo de vidrio que contenía 0,75 ml de solución TRIS base (3,025 g TRIS, 1,70 g ácido cítrico, 1,25 g fructosa, agua destilada csp. 100 ml) durante 10 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se colocó la cola del epidídimo y los 0,75 ml de TRIS en placa de petri para realizar el cutting y liberar los espermatozoides. Estos

espermatozoides así recuperados fueron sometidos a las siguientes pruebas de contrastación en el examen microscópico:

1) Concentración espermática (CE; $10^6/\text{ml}$), 10 μl de suspensión conteniendo espermatozoides epididimales recuperados se colocaron en un tubo conteniendo 2 ml de solución fisiológica formolada al 2%. Posteriormente se llenó la cámara de Neubauer por capilaridad y se realizó el conteo en el retículo central de la cámara (Johnston y col., 2001),

2) Motilidad individual (MI), 10 μl de suspensión conteniendo espermatozoides epididimales recuperados, se colocaron en un portaobjetos sobre platina térmica a 37°C . Luego se cubrieron con cubreobjetos y se observaron en microscopio óptico con una magnificación de 400X. Se estimó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva en 5 a 7 campos (Axner y Linde-Fosberg, 1998; Johnston y col., 2001),

3) Vigor (VI), se evaluó conjuntamente con la motilidad individual. Para establecer este parámetro se utilizó una escala de 1 a 5, en donde 1 y 2 corresponde a los espermatozoides con movimiento en el lugar, 3 corresponde a los espermatozoides con movimiento progresivo lento, 4 corresponde a los espermatozoides con movimiento progresivo rápido y 5 corresponde a los espermatozoides con movimiento progresivo muy rápido,

4) Porcentaje de vivos (PV), 10 μl de suspensión conteniendo espermatozoides epididimales recuperados se colocaron con 10 μl de colorante eosina-nigrosina sobre un portaobjetos a 37°C . Se mezclaron las gotas durante 30 segundos sobre platina térmica a 37°C . Se realizó un extendido y se contaron 100 células, las cuales se clasificaron en espermatozoides vivos y muertos con microscopio óptico con una magnificación de 1000X (Tittarelli y col., 2006),

5) Morfología espermática (ME; % espermatozoides normales,), se utilizó para su estudio tinción 15 Biopur[®], se observaron 100 células totales con microscopio óptico con una magnificación de 1000X. Se clasificaron las anomalías encontradas según su localización (cabeza, pieza intermedia y/o cola; Johnston y col., 2001),

6) Acrosomas intactos (AI, % de acrosomas intactos), se realizó mediante la técnica de *Pisum sativum* aglutinin-isotiocianato de fluoresceína. Se contaron 100 células y se clasificaron en dos grupos según posean acrosoma intacto o acrosoma dañado. Esta prueba se realizó en microscopio de fluorescencia con una magnificación de 1000X (Mendoza y col., 1992),

7) Integridad de membrana (IM, % membranas intactas) 20 µl de suspensión conteniendo espermatozoides epididimales recuperados se procesaron para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) y yoduro de propideo (YP). Se contaron 100 células y se clasificaron en dos grupos según posean la membrana plasmática intacta o alterada. Esta prueba se realizó en microscopio de fluorescencia con una magnificación de 1000X (Harrison y Vickers, 1990).

Las muestras de sangre obtenidas fueron centrifugadas y el suero se almacenó a -20°C hasta que las concentraciones de T fueron determinadas por RIA (Coat-A-Count[®], Testosterona; Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA; Coeficiente de Variación 4,9%).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA. Las variables categóricas se analizaron con PROC GENMOD y las continuas con PROC MIX de SAS[®]. La calidad

espermática y las concentraciones de testosterona sérica obtenida de gatos castrados en d con ascenso lumínico (AL, invierno-primavera; de 9h 51' a 14h 27') fue comparada con los parámetros espermáticos y hormonales obtenidos de gatos castrados en d con descenso lumínico (DL, verano-otoño; de 14h 27'a 9h 51').

Con los datos obtenidos a partir del estudio histológico testicular se realizó un análisis de varianza con el procedimiento PROC GENMOD y PROC MIX de SAS[®]. Se incluyó el efecto principal de estación como una variable independiente en el modelo (SAS Institute Inc., 1996).

Marco bioético del uso de animales

Este experimento se realizó respetando y de acuerdo con las recomendaciones internacionales especificadas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio y con las recomendaciones de la National Academy Science, Washinton DC, USA. Estas recomendaciones serán tenidas en cuenta en lo referente a la atención médico veterinaria, medio ambiente, alimentación, sanidad, identificación, sujeción, administración de drogas, toma de muestras sangre y procedimientos quirúrgicos (CIOMS, 1985).

RESULTADOS

Así como ocurre en otras especies fotoperiodicas, la producción espermática se mantiene constante a través del año mostrando variaciones estacionales en los parámetros seminales.

Los animales castrados en AL presentaron un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y membrana plasmática íntegra significativamente superior

a los gatos castrados en DL ($45,95 \pm 2,5$ vs. $35,95 \pm 3,4$; $P < 0,02$; $69,07 \pm 2,7$ vs. $60,66 \pm 2,1$, $P < 0,01$ respectivamente; Figura 2.3-A y B). Respecto a la motilidad y a la cantidad de espermatozoides totales, los animales castrados en AL presentaron una tendencia a tener mayor porcentaje de espermatozoides móviles y mayor cantidad de espermatozoides totales que aquellos castrados en DL ($56,30 \pm 2,8$ vs. $47,33 \pm 3,7$; $P < 0,06$; $13,89 \pm 1,4$ vs. $10,04 \pm 1,8$; $P < 0,09$; Figura 2.3-C y D). Sin embargo el vigor, el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos y la concentración de testosterona sérica fue similar en ambos grupos ($3,5 \pm 0,1$ vs. $3,4 \pm 0,1$; $45,83 \pm 3,3$ vs. $44,00 \pm 4,0$; $0,76 \pm 0,15$ vs. $0,59 \pm 0,19$; $P > 0,50$; respectivamente). El análisis de las morfoanomalías reveló diferencias significativas en las alteraciones localizadas en la cabeza cuando se comparó AL vs DL ($10,73 \pm 1,04$ vs $17,27 \pm 1,94$; $P < 0,05$). No se observaron diferencias en las alteraciones presentes en la pieza intermedia ni en la cola ($16,12 \pm 1,28$ vs $15,13 \pm 2,46$; $11,13 \pm 2,81$ vs $16,50 \pm 2,14$; $P > 0,05$).

El estudio histológico permitió observar una mayor cantidad de túbulos grado III y IV en animales castrados en d largos en comparación con los animales castrados en d cortos ($P < 0,001$; Figura 2.4). En concordancia, en gatos castrados en épocas con d cortos se encontró una mayor cantidad de túbulos grados I y II en comparación con las muestras provenientes de gatos castrados en d largos ($P < 0,001$; Figura 2.4). Los animales castrados durante AL presentaron una mayor cantidad de células de Sertoli por tubo y células de Leydig por campo, en comparación con los animales castrados en DL ($14,04 \pm 0,21$ vs. $12,12 \pm 0,22$; $42,63 \pm 1,63$ vs. $36,83 \pm 1,68$; $P < 0,01$, Figura 2.5-A y B). La testosterona sérica, mantuvo valores similares en gatos castrados en AL comparado con gatos castrados en DL ($0,76 \pm 0,15$ vs. $0,59 \pm 0,19$; $P > 0,51$).

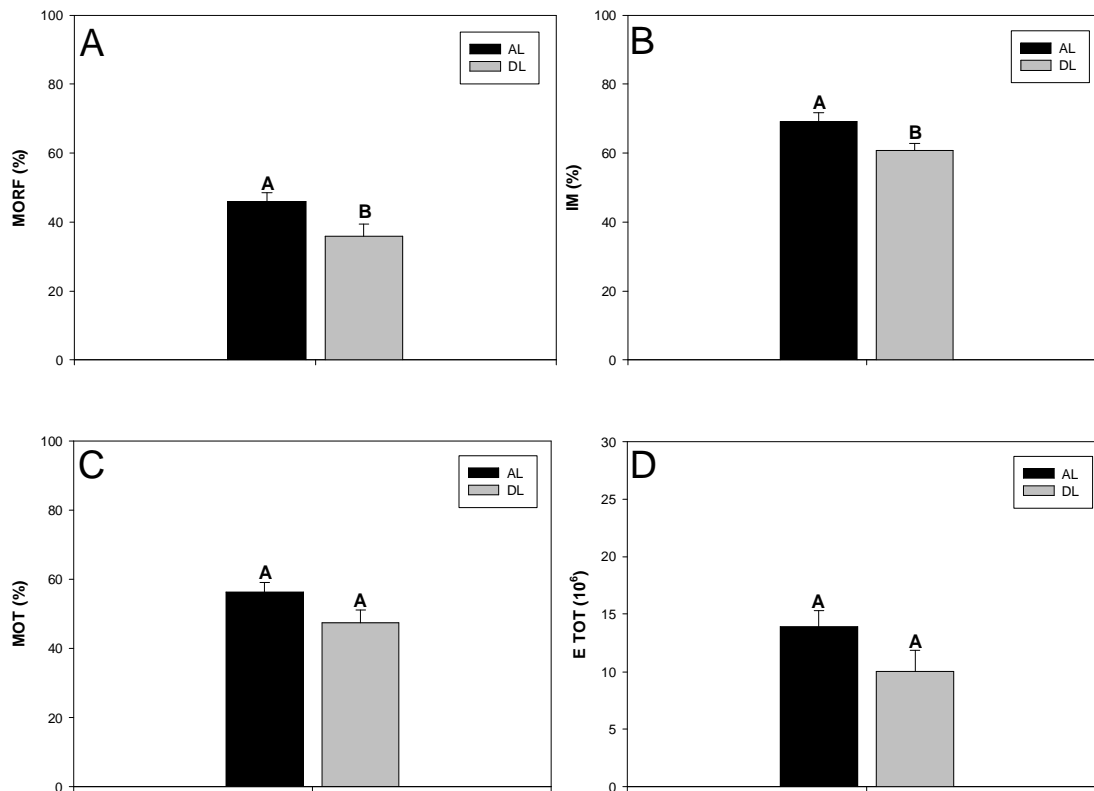


Figura 2.3. Variaciones estacionales de la morfología espermática (A), integridad de membrana (B), motilidad (C) y espermatozoides totales (D) epididimales de gatos castrados en ascenso lumínico (AL) y en descenso lumínico (DL). Valores indicados en LSM±SE. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (P<0,05).

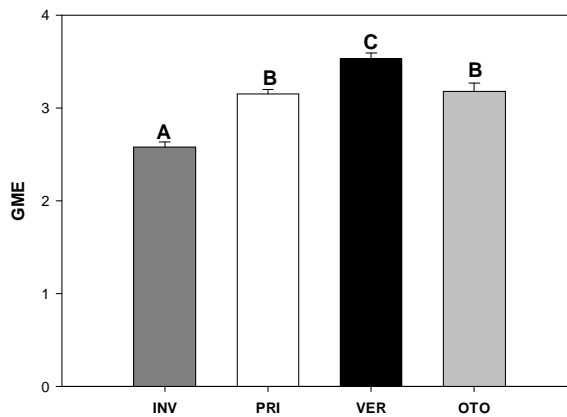


Figura 2.4. Variaciones en la cantidad de espermátides maduras en gatos castrados en diferentes estaciones. Valores indicados en LSM±SE. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas (P<0,05).

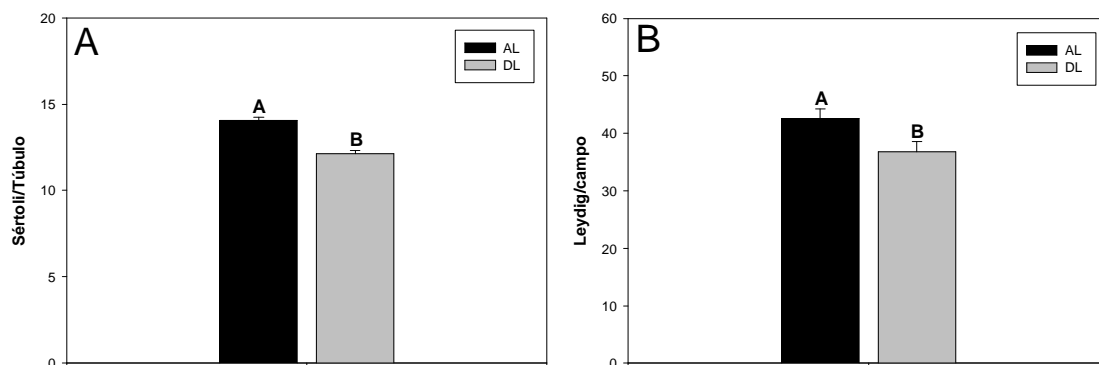


Figura 2.5. Variaciones estacionales en las células de Sértoli (A) y Leydig (B) en gatos castrados en ascenso lumínico (AL) y en descenso lumínico (DL). Valores indicados en LSM±SE. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P<0,05$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Si bien algunos estudios han concluido que los gatos domésticos no poseen estacionalidad reproductiva produciendo la misma calidad seminal a lo largo del año (Spindler y Wildt, 1999; Franca y Godinho, 2003), nuestros resultados evidencian que los gatos bajo fotoperiodo natural si bien mantienen la capacidad de producir semen durante todo el año presentan variaciones en la calidad espermática, no mostrando variaciones en la concentración de testosterona sérica. Este hecho se evidencia también a nivel testicular con cambios en el desarrollo de la hilera seminal.

Blottner y Jewgenow han encontrado en felinos fluctuaciones estacionales del peso testicular, la cantidad de espermatozoides testiculares, el porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides normales. Los mencionados parámetros fueron mayores en primavera que en otoño (Blottner y Jewgenow, 2007). Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados sobre los parámetros espermáticos epididimales, los cuales fueron superiores o mostraron tendencia a serlo en AL vs DL.

En un estudio retrospectivo realizado en Suecia, Axner y Linde Forsberg (2007) han comunicado que la morfología espermática está fuertemente influenciada por la estación del año, encontrando un mayor porcentaje de espermatozoides normales en eyaculados de gatos durante febrero a julio (en correspondencia con la estación reproductiva de la hembra) en comparación con los valores encontrados entre agosto y enero. Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados en los cuales gatos castrados en AL han presentado un mayor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, así como un mayor porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana plasmática comparados con gatos castrados en DL. Así mismo, la evaluación de las diferentes morfoanomalías presentes en espermatozoides epididimales recuperados de la cola del epidídimo, proporcionan resultados comparables con los hallazgos obtenidos por Axner y col. (1999) quienes encontraron entre el 8 y el 13% de anomalías en la cabeza y entre el 1 y el 20% de anomalías en la cola. El mismo estudio evidencia una motilidad progresiva del 60%, valores semejantes a los presentados en el presente trabajo.

La secreción nocturna de melatonina refleja los cambios fotoperiódicos en las especies domesticas determinando la estacionalidad reproductiva. Esta estacionalidad es observada en ambos sexos estimulando o inhibiendo la actividad ovárica y la producción espermática. (Chemineau y col., 2008). La actividad ovárica de la hembra felina bajo fotoperiodo natural se mantiene constante en días con más de 12 horas luz, determinando la estacionalidad reproductiva, la cual finaliza al disminuir la cantidad de horas luz diarias (Michel, 1993). En el macho felino, estudios recientes han mostrado cambios estacionales en la morfología testicular. Stornelli y col. (2009) han encontrado que muestras testiculares provenientes de gatos castrados durante los meses que presentan fotoperiodo largo poseían un mayor porcentaje de túbulos con espermatides

con colas y maduras comparado con testículos de machos orquiectomizados durante días de corta duración lumínica. Así mismo, testículos de gatos castrados en días de fotoperiodo largo tuvieron un menor porcentaje de túbulos con espermátides redondas y elongadas comparado con testículos de machos orquiectomizados en días de fotoperiodo corto. Las observaciones realizadas en este estudio concuerdan con los estudios previos mencionados, mostrando una mayor cantidad de túbulos con espermátides en estadios avanzados de maduración en días de largos. Mientras que en días cortos, se observó mayor cantidad de estadios inmaduros. En concordancia con nuestros resultados, Stornelli y col. (2009) observaron mayor cantidad de células de Leydig durante fotoperiodo largo en correspondencia con la mayor producción espermática presentada.

Así mismo en concordancia con las variaciones morfológicas testiculares y las variaciones en la calidad de los espermatozoides epididimales recuperados observadas en nuestro trabajo, estudios realizados en Australia muestran variaciones en el volumen seminal entre estación reproductiva y no reproductiva. En el mencionado trabajo el aumento de volumen seminal observado durante la estación reproductiva fue asociado a un aumento en la actividad de las glándulas accesorias (Johnstone, 1984).

Los valores de testosterona sérica obtenidos en este trabajo durante el AL, son similares a los valores hallados por Tsutsui y col. (1990) durante la estación reproductiva (0,72-1,60 con un promedio de 1,03 ng/ml). Sin embargo, los valores de testosterona sérica hallados en este experimento, han presentado grandes variaciones entre los animales evaluados. Estos hallazgos concuerdan con las comunicaciones realizadas por Tsutsui, quien encontró grandes variaciones entre individuos, así como variaciones entre las muestras obtenidas en un mismo animal, dependiendo del momento de la extracción. En ese trabajo se muestra un patrón de secreción episódico, sin ritmo diario de secreción. Este autor halló valores de testosterona sérica levemente

superiores durante la estación reproductiva (Tsutsui y col., 1990; Tsutsui y col., 2009). Así como se ha observado en nuestro trabajo, Blottner y col. (2007) encontraron gran variabilidad en los valores de testosterona testicular durante el estudio.

Si bien Johnstone y col. (1984), han comunicado una gran influencia de la estación del año sobre los niveles de testosterona sérica, detectándose mayores concentraciones de esta hormona durante la estación reproductiva, nuestros resultados muestran que las concentraciones séricas de testosterona no varían en relación al fotoperiodo. En concordancia con nuestros hallazgos Kirkpatrick (1985), ha comunicado solo leves diferencias en la concentración de testosterona sérica al comparar la estación reproductiva y la no reproductiva.

En conclusión, estos resultados demuestran que la calidad espermática epididimal, así como la morfología testicular presentan variaciones estacionales en relación al fotoperiodo y que estas variaciones no se encuentran reflejadas en las concentraciones de testosterona sérica.

CAPÍTULO III

REFRACTARIEDAD AL ESTÍMULO LUMÍNICO

INTRODUCCIÓN

La estacionalidad reproductiva se ha documentado en diversas especies de animales domésticos y silvestres como ovinos, caprinos, cérvidos, roedores y cánidos silvestres, los cuales presentan un período de reposo sexual estacional de duración e intensidad variable. La mencionada estacionalidad está directamente relacionada con las h luz diarias (fotoperiodo) a las que se hallan sometidos los animales y se evidencia en las zonas geográficas en las que existen marcadas variaciones en la duración del día durante el año. En estas especies, además de la estacionalidad sobre la actividad reproductiva también se ha evidenciado un fenómeno de insensibilidad al estímulo lumínico constante denominado fotorefractariedad (Stetson y col., 1977; Almeida y Lincoln, 1984; Forsberg y col., 1989).

La estacionalidad reproductiva en la gata doméstica es bien conocida. Durante los d largos de primavera y verano, en presencia de 12 h luz diarias y bajas concentraciones séricas de melatonina, la hembra presenta ciclos estrales repetidos. Durante el invierno, la concentración sérica de melatonina aumenta, la actividad ovárica cesa y la hembra entra en anestro. Estudios recientes demostraron que si bien el macho es capaz de producir semen durante todo el año, en primavera-verano coincidente con la estación reproductiva de la hembra, se produce semen de mejor calidad que durante otoño-invierno (época de anestro estacional de las gatas) (Axner y Linde Forsberg, 2007; Blottner y Jewgenow, 2007; Stornelli y col., 2009).

Da Silva y col. (2006) han comunicado que gatas mantenidas bajo un régimen lumínico de fotoperiodo de días largos (DL, 12 h luz: 12 h oscuridad) ciclaron en forma continua durante 6 meses. Así mismo, nuestro grupo de trabajo ha observado que gatas mantenidas con fotoperiodo continuo de días largos pueden ciclar en forma continua sin presentar evidencia de refractariedad lumínica (Gimenez y col, datos no publicados. En gatos machos sometidos a implantes de melatonina con el propósito de suprimir la espermatogénesis, también fue posible evidenciar en forma simultánea que presentaban un posible efecto refractario al estímulo lumínico. Este hecho se opone a los resultados observados en felinos hembra. Sin embargo, este fenómeno fotorefractario ha sido evidenciado en otras especies como roedores y pequeños rumiantes (Howles y col., 1982; Almeida y Lincoln, 1984; Chemineau y col., 1992; Stetson y col., 1977; Stetson y Tate-Ostroff, 1981; Stetson y col., 1983). Mientras se realizaba el estudio de implantes de melatonina, se evidenció un descenso en todos los parámetros seminales evaluados en animales tratados y controles, llegando a mantenerse una producción espermática basal en todos los animales en estudio, luego de permanecer varios meses bajo un régimen lumínico de fotoperiodo largo. Es así que, con el propósito de comprobar este hallazgo, nunca antes documentado en esta especie, se diseñó el siguiente experimento.

OBJETIVO

Evaluar si la refractariedad a un fotoperiodo largo puede ser revertida sometiendo a los gatos a un fotoperiodo corto, para luego cambiarlos a un fotoperiodo largo y de esta forma, recuperar la calidad seminal encontrada antes del periodo refractario.

HIPÓTESIS

El gato doméstico presenta refractariedad a un estímulo lumínico cuando se lo mantiene durante largos periodos de tiempo bajo un régimen lumínico de fotoperiodo largo, pudiendo revertirse el fenómeno sometiendo a los gatos a fotoperiodo corto, para luego volver a someterlos a un régimen lumínico de fotoperiodo largo, recuperando la calidad seminal observada antes de ocurrido el fenómeno de refractariedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

Animales

Se utilizaron gatos mestizos de pelo corto (n=8), clínicamente sanos, cuyo peso osciló entre 3 y 5 kg en un diseño completamente aleatorizado. Los gatos fueron alojados en una habitación acondicionada, en jaulas individuales, alimentados con alimento balanceado (Fit 32[®], Royal Cannin, Argentina) y agua *ad-libitum*.

Régimen lumínico

Desde el inicio del experimento los animales fueron alojados en una habitación acondicionada con régimen lumínico de d largos (DL; 12 h luz-12 h oscuridad) con lámparas incandescentes de 100 W a 50 cm de altura de los gatos (Michel, 1993; Gimenez y col., 2009). Luego de 45 d de aclimatación lumínica, los animales fueron mantenidos durante 18 meses bajo el régimen lumínico de d largos, antes de ser sometidos a fotoperiodo de d cortos (DC; 8 h luz-16 h oscuridad). El descenso lumínico de fotoperiodo largo (12h luz) a fotoperiodo corto (8 h luz) se realizó paulatinamente durante un mes a una tasa de 15 minutos día por medio. Los animales se mantuvieron

con fotoperiodo corto durante un mes antes de comenzar el ascenso lumínico, el cual fue realizado utilizando la misma tasa que en el descenso. El experimento concluyó luego que los animales permanecieron por un periodo de 2 meses bajo un régimen lumínico de fotoperiodo largo (Figura 3.1).

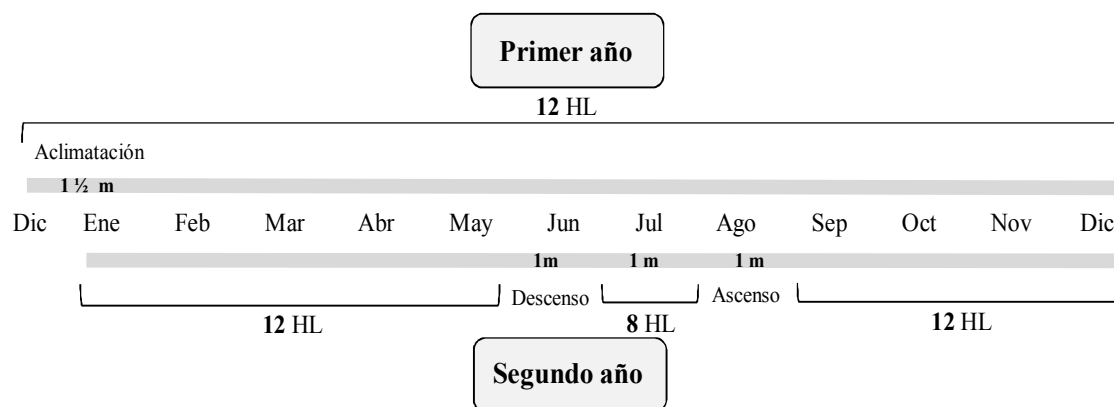


Figura 3.1. Manejo lumínico aplicado para evaluar la refractariedad sobre la calidad seminal

Toma de muestras y evaluación de semen

Las muestras seminales fueron obtenidas mediante electroeyaculación. Los gatos fueron anestesiados con xilacina (0,5mg/kg im; Kensol[®], Köning SA, Argentina) y ketamina (20 mg/kg im; Ketamina 50[®], Holliday-Scott SA, Argentina). La electroeyaculación fue realizada mediante la técnica descrita por Howard y col. (1990). Los animales recibieron un total de 80 estímulos divididos en 3 series (de 30, 30 y 20 impulsos respectivamente) con 2-3 minutos de descanso entre las series. La primera serie consistió en 10 estímulos de 2V, 10 estímulos de 3V y 10 estímulos de 4V. La segunda serie consistió en 10 estímulos de 3V, 10 estímulos de 4V y 10 estímulos de 5V. Por último se aplicaron 10 estímulos de 4V y 10 estímulos de 5V. La muestra

seminal fue colectada en un tubo de 1,5 ml precalentado a 37°C y sometida a las mismas pruebas de contrastación microscópica descritas en el experimento I.

Desde el inicio del experimento y, una vez concluida la aclimatación, se realizó extracción de semen a todos los animales una vez cada 14 d durante 4 meses (L12-1). Ocho meses después de finalizado L12-1 se recomenzó con los muestreos cada 14 d durante 4 meses (L12-2). Cuando los animales comenzaron con DC los muestreos se realizaron cada 28 d durante 2 meses (L8). Al regresar a DL las evaluaciones seminales se tomaron cada 14 d hasta finalizar el experimento (L13-3; Figura 3.2). Cada vez que se obtuvo un eyaculado, se tomaron muestras de sangre para determinación de concentración de T sérica. Todas las muestras de sangre fueron centrifugadas y el suero almacenado a -20°C hasta que las determinaciones de las concentraciones de T sérica fueran determinadas por el método de RIA (Coat-A-Count®, Testosterona; Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, Coeficiente de Variación 2,33%).

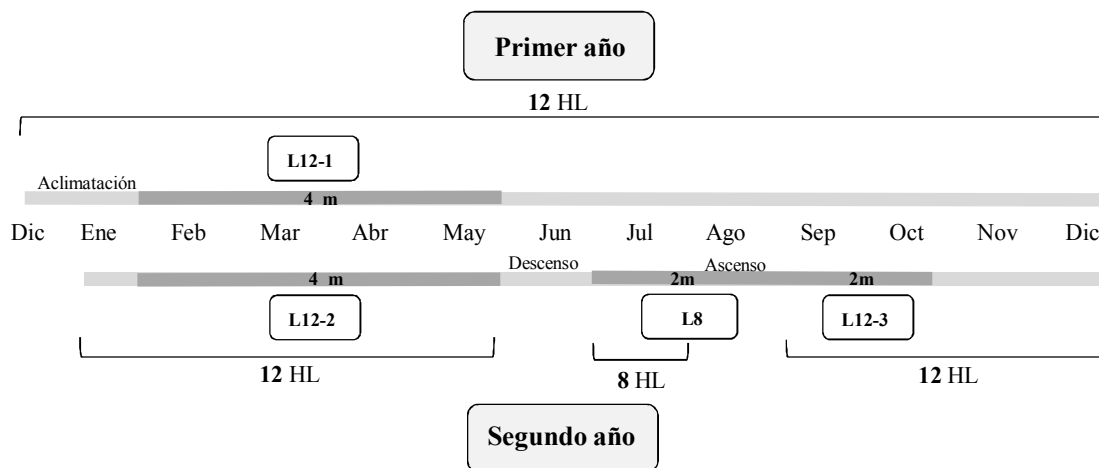


Figura 3.2. Diseño experimental aplicado para evaluar el efecto de refractariedad lumínica sobre la calidad seminal. Las líneas oscuras representan el periodo de toma de muestras. Los periodos en los que se dividieron los diferentes muestreos seminales se encuentran en los recuadros. La cantidad de h luz a la que fueron sometidos los animales se encuentran indicadas con corchetes.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA. Las variables categóricas fueron analizadas con PROC GENMOD y las continuas con PROC MIX de SAS[®].

Marco bioético del uso de animales

Este experimento se realizó siguiendo las mismas pautas para el cuidado y uso de animales de laboratorio detalladas en el capítulo II.

RESULTADOS

La motilidad, vigor, volumen, concentración espermática, cantidad de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto, porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales fue mayor en DL comparados con el periodo refractario DL (L12-1y L12-3 vs. L12-2; $86,96 \pm 2,1$ vs. $72,23 \pm 2,7$; $4,79 \pm 0,07$ vs. $3,84 \pm 0,09$; $0,18 \pm 0,01$ vs. $0,12 \pm 0,01$; $172,08 \pm 18,6$ vs. $47,40 \pm 23,9$; $25,23 \pm 2,4$ vs. $5,63 \pm 3,1$; $75,91 \pm 1,9$ vs. $58,32 \pm 2,5$; $77,70 \pm 2,0$ vs. $53,81 \pm 2,7$; $83,95 \pm 1,6$ vs. $58,95 \pm 2,5$; $63,72 \pm 1,4$ vs. $48,37 \pm 1,8$; $P < 0,01$; respectivamente; Figura 3.3-A, B, C, D, E, F; Figura 3.4-A, B, y C). La concentración de testosterona sérica no tuvo variaciones cuando se comparó DL con el periodo refractario DL (L12-1y L12-3 vs. L12-2: $1,55 \pm 0,14$; Figura 3.4-D). El vigor, el porcentaje de espermatozoides vivos, el porcentaje de acrosomas íntegros, el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra, la morfología espermática y la concentración de testosterona fue superior en DL comparada con DC (L12-1 y L12-3

vs. L8; $4,79 \pm 0,07$ vs. $4,36 \pm 0,12$; $75,91 \pm 1,9$ vs. $61,25 \pm 3,6$; $77,70 \pm 2,1$ vs. $64,38 \pm 4,6$; $83,95 \pm 1,6$ vs. $71,69 \pm 3,6$; $63,72 \pm 1,4$ vs. $57,12 \pm 2,6$; $1,55 \pm 0,17$ vs. $1,87 \pm 0,29$ $P < 0,05$; respectivamente; Figura 3.3-B, C, y F; Figura 3.4-A, B, C y D). La motilidad, el volumen, la concentración y la cantidad de espermatozoides totales fueron similares para ambos grupos (L12-1 y L12-3 vs. L8; $85,00 \pm 2,3$; $0,18 \pm 0,01$; $160,70 \pm 21,7$; $27,7 \pm 4,2$; $P > 0,20$; Figura 3.3-A, D, E y F). La motilidad, el vigor, el porcentaje de espermatozoides vivos, el porcentaje de espermatozoides con acrosomas íntegros y la integridad de la membrana plasmática fueron similares en el periodo refractario DL comparado con DC (L12-2 vs. L8; $77,62 \pm 4,5$; $4,1 \pm 0,1$; $59,78 \pm 3,7$; $59,09 \pm 4,2$; $65,32 \pm 5,1$; $P > 0,05$; respectivamente; Figura 3.3-A, B y C; 3.4-A y B). El volumen, la concentración, la cantidad de espermatozoides totales, la morfología espermática y la concentración de testosterona fueron menores en el periodo refractario DL comparado con DC (L12-2 vs. L8; $0,12 \pm 0,01$ vs. $0,18 \pm 0,01$; $47,40 \pm 15,6$ vs. $149,33 \pm 24,8$; $5,63 \pm 3,0$ vs. $30,12 \pm 4,6$; $48,37 \pm 1,8$ vs. $57,12 \pm 2,76$; $1,39 \pm 0,1$ vs. $1,87 \pm 0,2$; $P < 0,05$; respectivamente; Figura 3.3-D, E y F; 3.4-C y D).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La fotorefractariedad es un fenómeno que ocurre en varias especies. En *Mesocricetus auratus*, el periodo fotorefractario puede ser revertido al cambiar el fotoperiodo largo a fotoperiodo corto durante 11 semanas (Stetson y col., 1977; Stetson y Tate-Ostroff, 1981). Nuestros resultados concuerdan con estos estudios realizados en roedores. El mismo fenómeno también se ha observado en yeguas mantenidas bajo fotoperiodo artificial constante de d largos o cortos. En las mismas se evidenció una reactivación de los ciclos independiente de la condición lumínica de d cortos o d largos en la que se encontraban los animales (Nagy y col., 2000).

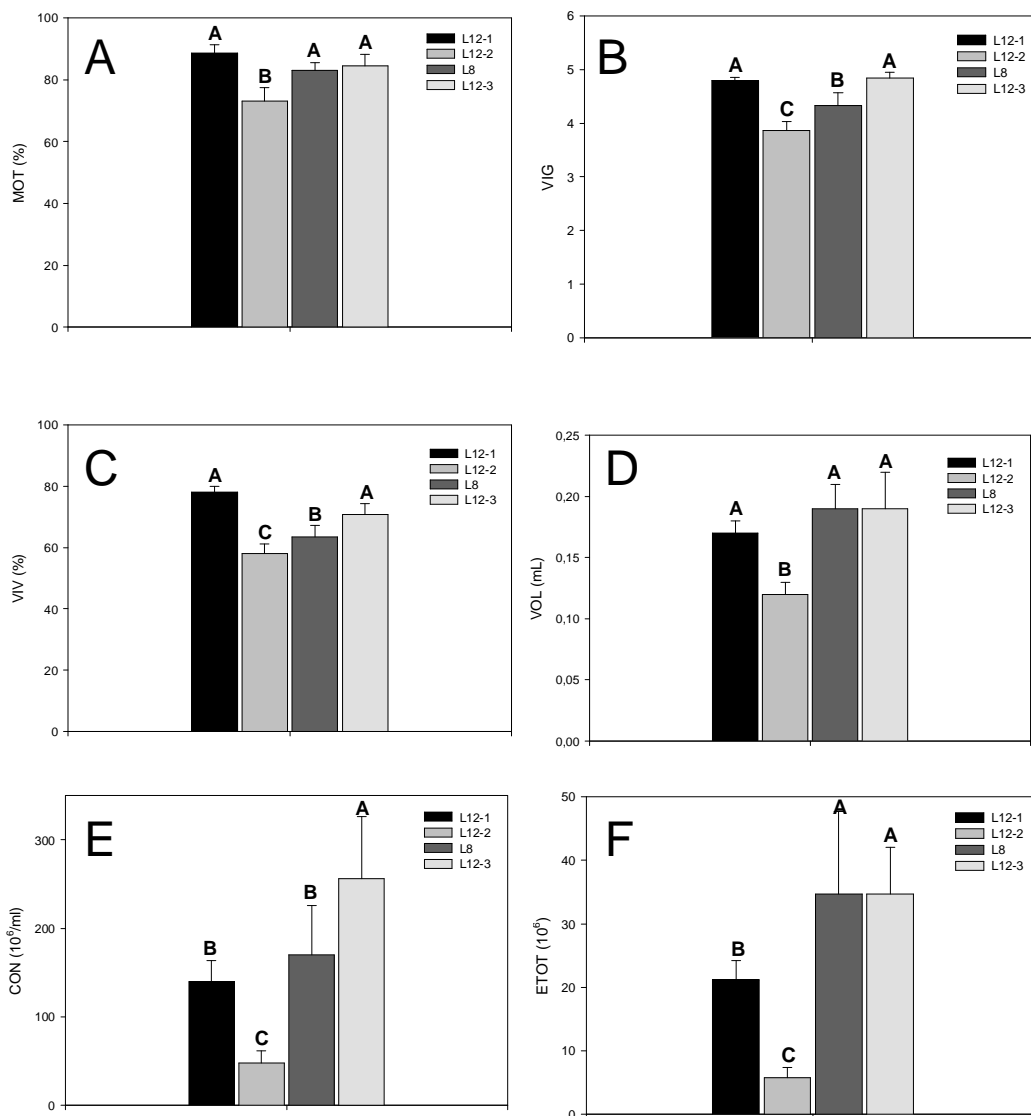


Figura 3.3. Cambios evidenciados en la motilidad (A), el vigor (B), el porcentaje de espermatozoides vivos (C), el volumen seminal (D), la concentración espermática (E) y la cantidad de espermatozoides totales (F) en gatos mantenidos con diferentes variaciones luminicas. L12-1: primer muestreo, fotoperiodo largo (4 meses). L12-2: periodo refractario al fotoperiodo largo (4 meses). L8: fotoperiodo corto (2 meses). L12-3: tercer muestreo, fotoperiodo largo (2 meses). Valores indicados en LSM \pm SE. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).

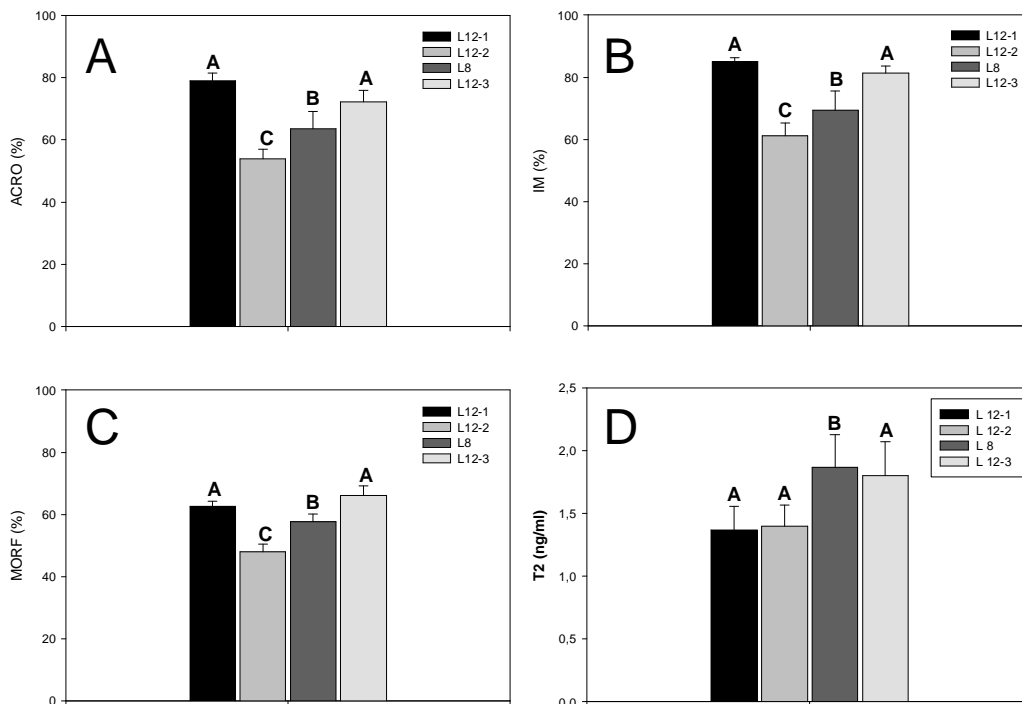


Figura 3.4. Cambios evidenciados en el porcentaje de acrosomas intactos (A), el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra (B), el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (C) y la concentración de T sérica (D) en gatos mantenidos con diferentes variaciones luminicas. L12-1: primer muestreo, fotoperiodo largo (4 meses). L12-2: periodo refractario al fotoperiodo largo (4 meses). L8: fotoperiodo corto (2 meses). L12-3: tercer muestreo, fotoperiodo largo (2 meses). Valores indicados en LSM±SE. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

El efecto de fotorefractariedad ha sido comunicado también en especies fotoperiodicas negativas, como el zorro azul (*Alopex lagopus*) y plateado (*Vulpes vulpes*), en las cuales los días cortos son necesarios para estimular el eje gonadal (Smith y col., 1984; Smith y col., 1986; Forsberg y col., 1989). Sin embargo, estos animales muestran regresión testicular luego de un periodo de aproximadamente 1 año de fotoperiodo corto artificial, siendo la calidad seminal muy pobre y con mala capacidad fecundante pos-descongelado (Forsberg y col., 1989). Así mismo, zorros sometidos a fotoperiodo natural de ascenso lumínico durante 4 meses, mostraron un rápido

desarrollo testicular cuando fueron transferidos a fotoperiodo artificial de días cortos, demostrando de esta forma el efecto estimulador de los días cortos sobre la espermatogénesis (Forsberg y col., 1989). Las observaciones realizadas en estos estudios son similares a nuestros hallazgos, en los cuales los gatos mantenidos bajo fotoperiodo largo presentan buena calidad espermática al inicio del periodo, pero una pobre producción espermática hacia el final de los 18 meses de exposición a fotoperiodo largo. Almeida y Lincoln (1984) demostraron que carneros expuestos a días de corta duración lumínica durante 94 semanas tenían estimulada su actividad testicular durante las primeras 16 semanas, a partir de la cual, se observaron periodos de desarrollo e involución testicular. Estos cambios cíclicos en la actividad gonadal independientes del fotoperiodo al cual están expuestos los animales, evidencian fotorefractariedad y se presentan como una adaptación al estímulo lumínico constante. Sin embargo, la fotorefractariedad observada luego de 94 semanas de fotoperiodo de días de corta duración lumínica constante, pudo ser revertida exponiendo a los animales a fotoperiodo de d de larga duración lumínica durante 16 semanas. Esto evidencia una rápida respuesta hormonal y testicular 3 semanas después de realizado el cambio lumínico. Es así, que para mantener una buena calidad seminal en carneros se han propuesto manejos lumínicos con el fin de inhibir el fenómeno fotorefractario. Se ha determinado, que ciclos lumínicos de 2 meses (1 mes fotoperiodo largo: 1 mes fotoperiodo corto) o de 4 meses (2 meses fotoperiodo largo: 2 meses fotoperiodo corto) son capaces de mantener el tamaño testicular y una buena calidad seminal durante 3 años (Delgadillo y col., 1993). Nuestros hallazgos concuerdan con las observaciones realizadas en carneros, mostrando que en los felinos la disminución en la calidad seminal debida a fotorefractariedad puede revertirse por el cambio de días largos a días cortos durante un mes.

Esta es la primera comunicación que describe un descenso de la cantidad y calidad espermática debida a refractariedad al fotoperiodo largo en el gato doméstico. Los parámetros seminales evaluados retornaron a valores semejantes a los del inicio del experimento, luego del cambio lumínico. Los cambios inducidos por el fotoperiodo largo mantenido durante 18 meses, pueden ser revertidos cuando se cambia a un fotoperiodo corto. Estos resultados confirman la hipótesis propuesta en este experimento.

CAPÍTULO IV

EFICACIA FARMACOLÓGICA DE IMPLANTES DE MELATONINA

INTRODUCCIÓN

Algunas especies de animales tanto domésticos como silvestres presentan periodos de actividad sexual seguidos por períodos de reposo de duración e intensidad variable (Farstad, 2000; Chemineau y col., 2004; Martinez-Pastor y col., 2005; Chemineau y col., 2008; Schon y Blottner, 2008). La mencionada estacionalidad reproductiva está relacionada con diversos factores, dentro de los cuales, el de mayor relevancia en regiones templadas, es el fotoperiodo. Éste determina el momento del año en que se produce la temporada reproductiva, regulando así su inicio y duración (Chemineau y col., 1996; Malpoux y col., 1996). Algunos animales inician la temporada reproductiva durante los meses de días cortos, son fotoperiódicos negativos, por ejemplo algunas razas de ovejas, cabras, ciervos y zorros (Forsberg y col., 1989; Wayne y col., 1990; Martinez-Pastor y col., 2005). Otros en cambio, poseen su temporada reproductiva durante los días largos de primavera y verano, son fotoperiódicos positivos, como algunas especies de roedores, caballos y gatos (Stetson y Tate-Ostroff, 1981; Nagy y col., 2000; Johnston y col., 2001).

Como se ha descrito hace ya varias décadas la gata doméstica es poliéstrica estacional. Los ciclos estrales comienzan cuando está expuesta a d largos (Feldman y Nelson, 1996; Robledo y col., 2003). Por el contrario, cuando el fotoperiodo es corto (8 h luz) la gata permanece en anestro (Leyva y col., 1989; Johnston y col., 2001). En el macho, la sensibilidad al fotoperiodo también ha sido observada. Si bien el gato

presenta una producción espermática continua a través del año la calidad espermática y la cantidad de espermatozoides es significativamente superior durante la temporada reproductiva (primavera- verano; Blottner y Jewgenow, 2007). Las variaciones seminales que ocurren durante el año han hecho que fuera complejo establecer los parámetros que debe tener un semen normal de buena calidad en el gato doméstico. Es así, que no han sido definidos aun los valores del spermograma normal en esta especie. Algunos autores han encontrado alrededor de 40% de espermatozoides morfológicamente normales en gatos mestizos, mientras que otros sugieren que el porcentaje sería mayor al 60% (Wildt y col., 1983; Howard y col., 1990; Axner y Linde Forsberg, 2007). Sin embargo, existen grandes variaciones entre diferentes animales y aún entre muestras del mismo animal cuando se utiliza electroeyaculación (Pineda y col., 1984; Zambelli y Cunto, 2006). Este hecho adquiere gran importancia cuando se quieren estimar los parámetros seminales normales de un animal en particular, siendo necesarias no menos de cinco evaluaciones repetidas en el tiempo para determinar la calidad seminal de un macho felino (Johnstone, 1984). El fotoperiodo y las fluctuaciones en la secreción y concentración sérica de MEL son factores relevantes que actúan sobre la estacionalidad reproductiva. La concentración sérica de MEL es baja durante los períodos de actividad ovárica (estro) y alta durante los períodos de inactividad (anestro, interestro; Leyva y col., 1984). Es así, que la administración de MEL se ha utilizado para suprimir el desarrollo folicular en gatas expuestas a fotoperiodo largo (Leyva y col., 1989; Graham y col., 2004). Sin embargo, la administración de MEL no bloquea la percepción de la luz, por lo que el aumento de la síntesis estrogénica relacionada con el desarrollo folicular ocurre inmediatamente después de finalizada la administración de la hormona. Por el contrario, las hembras felinas a las cuales no se les administró MEL tardaron aproximadamente 45 días en

manifestar desarrollo folicular y la consecuente producción de estrógenos bajo el mismo régimen lumínico (Leyva y col., 1989).

De manera semejante la aplicación de un implante de MEL de 18 mg durante el interestro ha evitado la ocurrencia de celos durante 4 meses sin que se presenten efectos colaterales. Esto permite un control reversible y económico del ciclo estral en la gata (Gimenez y col., 2009). Sin embargo, el uso de concentraciones mayores de MEL (implantes de 36 mg) no logró aumentar la duración del interestro post-implante (Stornelli y col., 2008).

No se han realizado aun trabajos que estudien el efecto de la MEL sobre la producción espermática en el gato doméstico. No obstante, los estudios realizados sobre el efecto de MEL en la gata así como la relación existente entre las horas luz y la producción espermática en el gato macho sugieren que la administración de MEL podría influir sobre el ciclo espermático en felinos (Leyva y col., 1989; Graham y col., 2004; Blottner y Jewgenow, 2007).

Es así que, la aplicación de un implante de MEL que suprima la producción espermática en el gato doméstico sin ocurrencia de efectos colaterales adversos permitiría un control reversible y económico de la producción espermática en felinos.

OBJETIVO

Evaluar la eficacia farmacológica de implantes de melatonina en gatos para suprimir la espermatogénesis.

HIPÓTESIS

Los implantes de melatonina suprimen la espermatogénesis sin que ocurran efectos colaterales que afecten la calidad de vida del animal o pongan en riesgo su supervivencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Debido a limitantes de espacio y disponibilidad de animales se dividió el número total de animales (n=16) en dos repeticiones de 8 animales cada una (n=8, CON=4 y TRT=4; TOTAL n=16, CON=8 y TRT=8). En la primera etapa del experimento, donde se realizó el estudio de los primeros 8 animales, se observó el efecto de refractariedad que dio origen a la realización del estudio de Refractariedad al estímulo lumínico en esta tesis.

Se utilizaron gatos mestizos de pelo corto, clínicamente sanos, cuyo peso oscilaba entre 3 y 5 kg en un diseño completamente aleatorizado. Los gatos fueron alojados en una habitación acondicionada, en jaulas individuales, alimentados con alimento balanceado (Fit 32[®], Royal Cannin, Argentina) y agua *ad-libitum*. Se utilizó un régimen de luz artificial de fotoperiodo largo (12 h de luz diarias) con lámparas incandescentes de 100 W a 50 cm de altura de los gatos (Michel, 1993; Gimenez y col., 2009). Luego de permanecer 138 días (45 días de adaptación + 2 ciclos de la espermatogénesis (1 ciclo= 46,8 días) se comenzó con la toma de muestras seminales previo a la inclusión de los gatos como animal experimental. Debido a la variabilidad ocurrida entre los eyaculados de un mismo animal, se decidió coleccionar siete eyaculados antes de incluir a los animales en el estudio.

Una vez finalizado el periodo de aclimatación, se colectó mediante electroeyaculación un total de siete eyaculados (n=7) por animal realizando una extracción de semen cada 14 d. Como criterio de aceptación de un macho como animal experimental se tomaron los siguientes parámetros seminales: CE, $>12 \times 10^6$; MI, $>70\%$; VI, >4 ; PV, $>80\%$; AI, $>80\%$; ME, $>50\%$ (Axner yLinde Forsberg, 2007). Por lo tanto, sólo aquellos machos que produjeron semen de calidad igual o superior a la requerida en 7 extracciones preliminares consecutivas fueron incluidos en el experimento. Los gatos asignados al primer tratamiento recibieron un implante de melatonina (Syntex[®], Argentina, 18 mg; TRT, n=4). Los gatos asignados al segundo tratamiento recibieron un implante sin melatonina (placebo, 0 mg; CON, n=4).

A todos los animales se les realizó el protocolo de electroeyaculación cada 14 d hasta que los valores seminales de al menos 3 eyaculados fueron semejante a los obtenidos previa colocación del implante. Las muestras obtenidas fueron sometidas a las mismas pruebas de contrastación detalladas en el capítulo II.

Desde el ingreso de los animales al régimen lumínico hasta el final del experimento, cada vez que se obtuvo un eyaculado, se tomaron muestras de sangre para determinación de concentración de T sérica. Todas las muestras de sangre fueron centrifugadas y el suero almacenado a -20°C hasta que las determinaciones de las concentraciones de T sérica fueran determinadas por el método de RIA (Coat-A-Count[®], Testosterona; Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, Coeficiente de Variación 2,33%).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA. Las variables categóricas fueron analizadas con PROC GENMOD y las continuas con PROC MIX de SAS®.

Marco bioético del uso de animales

Este experimento se realizó siguiendo las mismas pautas para el cuidado y uso de animales de laboratorio detalladas en el capítulo II.

RESULTADOS

Los resultados mostraron el efecto de los implantes de melatonina en el grupo TRT. La motilidad, vigor, cantidad de espermatozoides totales, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto, el porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales fue significativamente menor en animales tratados comparados con controles (TRT vs. CON $76,21 \pm 1,60$ vs. $86,37 \pm 1,80$; $3,97 \pm 0,05$ vs. $4,74 \pm 0,05$; $4,12 \pm 1,55$ vs. $25,85 \pm 1,93$; $52,37 \pm 2,58$ vs. $61,00 \pm 2,69$; $61,37 \pm 2,85$ vs. $76,43 \pm 3,00$; $54,31 \pm 3,01$ vs. $70,17 \pm 3,23$; $P < 0,05$; Figura 4.1-A, B y C; Figura 4.2-A, B, y C). Si bien el porcentaje de espermatozoides vivos muestra una tendencia a ser menor en los animales tratados respecto de los controles, la diferencia no fue significativa ($62,44 \pm 2,67$ vs. $70,90 \pm 2,83$; $P 0,06$; Figura 3.1-D). El volumen y la concentración de testosterona sérica no mostraron diferencias significativas entre los grupos ($0,15 \pm 0,02$; $1,13 \pm 0,16$ CV 18,97%; $P > 0,05$)

Estos resultados indican que los parámetros seminales de los animales TRT disminuyeron 91 ± 7 d luego de la colocación del implante para mantenerse bajos

durante un periodo de 90 a 100 d y retornar a los valores pre-implante entre 248 ± 6 d pos-implante.

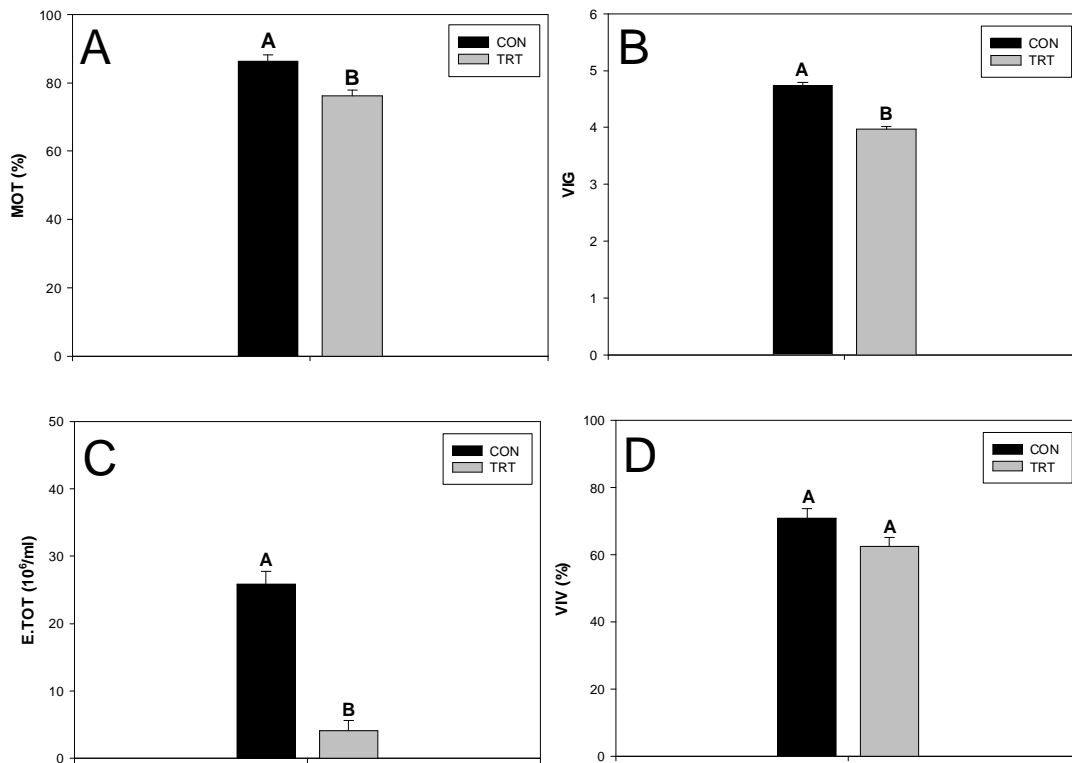


Figura 4.1. Variaciones en la motilidad (A), vigor (B), cantidad de espermatozoides totales (C) y porcentaje de espermatozoides vivos (D) en gatos controles (CON) y con implante de melatonina (MEL). Valores expresados en $LSM \pm SE$. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

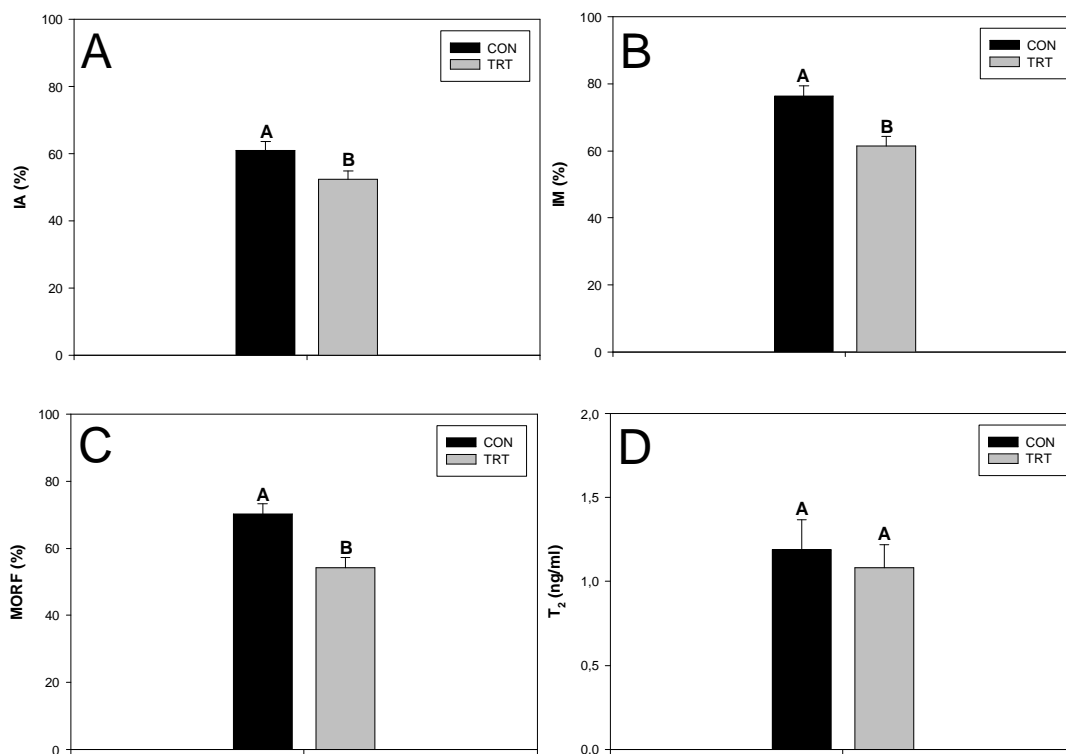


Figura 4.2. Variaciones en el porcentaje de acrosomas intactos (A), porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra (B), cantidad de espermatozoides morfológicamente normales (C) y concentración de testosterona sérica (D) en gatos controles (CON) y con implante de melatonina (MEL). Valores expresados en LSM±SE. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En la gata el tratamiento con melatonina vía subcutánea (5 mg d por medio) durante 60 d logró suprimir la actividad folicular en gatas mantenidas con fotoperiodo largo de 24 h luz (Leyva y col., 1989). Del mismo modo, la actividad folicular fue suprimida mediante administración oral de 30 mg diarios de melatonina durante 30 d (Graham y col., 2004). Un estudio reciente muestra que la colocación de implantes de 18 mg de MEL en gatas durante el interestro logra evitar los ciclos estrales durante 4

meses sin ocurrencia de efectos colaterales adversos (Gimenez y col., 2009). Así como ocurre en otras especies fotoperiodicas, en el presente estudio podemos observar que la sensibilidad al fotoperiodo en el gato doméstico es diferente para ambos sexos. La utilización de un implante de 18 mg de melatonina si bien no causó supresión de la espermatogénesis produjo a una significativa reducción en los parámetros seminales por un periodo de 90 a 100 d. La disminución de la calidad seminal encontrada en los animales que recibieron el implante de MEL coincide con las observaciones realizadas por Tsutsui y col. (2009) quienes encontraron parámetros seminales significativamente más bajos en muestras de eyaculados felinos estudiados durante la temporada no reproductiva de la hembra, en comparación con los encontrados durante la época reproductiva. Así mismo, los parámetros seminales inducidos por los implantes de melatonina fueron inferiores a los encontrados en gatos mantenidos con fotoperiodo corto (8 h luz), llegando a ser semejante a los valores encontrados durante el periodo refractario a d largos del capítulo III. Estos hallazgos concuerdan con las observaciones de Lincoln y Ebling (1985) en carneros, las cuales muestran que cambios en la actividad testicular semejantes a los producidos por un largo periodo de d cortos ocurren en animales tratados con implantes de melatonina durante 10 meses. En el presente estudio, los valores de los parámetros seminales de los gatos controles se mantuvieron semejantes a los valores correspondientes a los animales del capítulo III en el periodo L12-1 y L12-3.

El porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales fue significativamente mayor en los animales controles que en los tratados. Esta observación se corresponde con los hallazgos de Axner y Linde Forsberg (2007), quienes observaron un promedio de 56% de espermatozoides normales durante la temporada reproductiva y de un 36% durante la temporada no reproductiva. Así mismo,

el porcentaje de espermatozoides normales encontrados por Axner y Linde Forsberg (2007) en la época no reproductiva es semejante al encontrado en este trabajo en los animales tratados con MEL.

Blottner y col. (2007) comunicaron que en el gato se presentan variaciones en la motilidad y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales al comparar los datos obtenidos en primavera con los del otoño, encontrando mejores valores durante la primavera, lo cual coincide con la temporada reproductiva de la hembra. Nuestros resultados concuerdan con esta observación, ya que los valores de motilidad progresiva y de espermatozoides normales fueron significativamente menores en los gatos tratados con MEL, lo cual podría compararse con lo que ocurre fisiológicamente durante la temporada no reproductiva (fotoperiodo corto). En concordancia, en el capítulo II se evidenció una mejora de la motilidad y de la cantidad de espermatozoides normales en muestras provenientes de gatos orquiectomizados durante el ascenso lumínico en comparación con los gatos castrados en descenso lumínico.

Algunos investigadores han comunicado una gran influencia de la estación del año sobre los niveles de testosterona sérica y testicular, siendo mayores las concentraciones hormonales durante el periodo reproductivo de la hembra (Johnstone y col., 1984; Blottner y Jewgenow, 2007). Los resultados de este trabajo muestran que la concentración de testosterona no presenta variaciones con la utilización de implantes de melatonina. Así mismo en el experimento I tampoco se evidenciaron variaciones hormonales relacionadas con el fotoperiodo. En concordancia con estos hallazgos Kirkpatrick, ha comunicado solo leves diferencias en la concentración de testosterona sérica al comparar la estación reproductiva y la no reproductiva, ambas en concordancia con los resultados de nuestro estudio (Kirkpatrick, 1985).

El control de las poblaciones de gatos callejeros ha sido y continúa siendo un desafío en medicina veterinaria con el fin de evitar zoonosis y sufrimiento de gatos abandonados (Jessup, 2004; Robertson, 2008). Si bien los implantes de melatonina han sido usados para el control de la reproducción en la gata, no se habían realizado estudios sobre la acción de esta hormona en el desarrollo de la hilera seminal y calidad de semen en machos felinos. Los resultados de este estudio permiten demostrar que el periodo de disminución de la calidad seminal es de 90 a 100 d comparable con los 4 meses de interestro logrado en las hembras con el uso de implantes de 18 mg de melatonina.

Se han realizado algunos estudios sobre el uso de agonistas GnRH y bisdiamina, un químico que afecta la espermatogénesis, con el fin de implementar protocolos anticonceptivos en felinos machos (Munson y col., 2004; Novotny y col., 2012). Si bien estos protocolos han mostrado ser efectivos para afectar la espermatogénesis, existen pocos datos que demuestren el retorno de una espermatogénesis normal luego de su uso y los efectos colaterales a largo plazo. Es así que los implantes de melatonina ofrecen una opción para el control reversible de la reproducción en el macho, ya que logran disminuir la calidad seminal a valores semejantes a los hallados en la época no reproductiva de la hembra, sin producir efectos colaterales adversos durante su acción.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES

Por los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis se puede inferir que la calidad espermática epididimal, así como la morfología testicular presentan variaciones estacionales en relación al fotoperiodo. Según nuestras observaciones el gato doméstico presenta estacionalidad reproductiva al igual que la gata. Así como ocurre en otras especies estacionales, en el gato doméstico puede observarse el fenómeno de fotorefractariedad al fotoperiodo largo, el cual puede revertirse sometiendo a los animales a fotoperiodo corto, recuperando la sensibilidad al estímulo lumínico al volver a fotoperiodo largo. El uso de implantes de melatonina produce disminución de la calidad seminal por un periodo de 90 a 100 d, siendo este efecto reversible.

Es así que puede clasificarse al gato como animal que presenta estacionalidad reproductiva produciendo semen de mejor calidad en la época de fotoperiodo largo en concordancia con la estación reproductiva de la gata. Al igual que otras especies fotoperiodicas, el gato presenta el fenómeno de fotorefractariedad el cual puede ser revertido sometiendo a los animales a un manejo lumínico adecuado. En relación a las características reproductivas felinas los implantes de melatonina ofrecen una opción para el control reversible de la espermatogénesis en el macho, ya que logran disminuir la calidad seminal a valores semejantes a los hallados en la estación de días cortos en concordancia con el anestro estacional de la gata sin producir efectos colaterales adversos.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

1. Aisen EG. Características anatómicas y funcionales del sistema reproductor del macho. En: Reproducción Ovina y Caprina. Buenos Aires, Inter-Médica, 2004, 1-10.
2. Almeida OF, Lincoln GA. Reproductive photorefractoriness in rams and accompanying changes in the patterns of melatonin and prolactin secretion. Biol Reprod. 1984; 30: 143-158.
3. Arendt J, Symons AM, Laud CA, Pryde SJ. Melatonin can induce early onset of the breeding season in ewes. J Endocrinol. 1983; 97: 395-400.
4. Avdi M, Banos G, Stefos K, Chemineau P. Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams. Theriogenology. 2004; 62: 275-282.
5. Axner E. Sperm maturation in the domestic cat. Theriogenology. 2006; 66: 14-24.
6. Axner 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: 767-778.
7. Axner E, Linde-Fosberg C. Mating and artificial insemination. En: Small animal reproduction and neonatology. Cheltenham, UK., BSAVA, G. E. Simpson, G. C. and Harvey, M. , 1998, p.105-111.
8. Axner E, Linde Forsberg C. Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. Reprod Domest Anim. 2007; 42: 282-291.
9. Barrell GK, Thrun LA, Brown ME, Viguie C, Karsch FJ. Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the ewe. Biol Reprod. 2000; 63: 769-774.
10. Blottner S, Jewgenow K. Moderate seasonality in testis function of domestic cat. Reprod Domest Anim. 2007; 42: 536-540.
11. Blottner S, Schoen J. Minimal activity in both proliferation and apoptosis of interstitial cells indicates seasonally persisting Leydig cell population in roe deer. Cell Tissue Res. 2005; 321: 473-478.

12. Bronson F. Environmental Regulation: Some general principles. En: *Mammalian Reproductive Biology*. Chicago, The University of Chicago Press, 1989; p.7-27.
13. CIOMS 1985. Council for International Organizations of Medical Sciences. International guiding principles for biomedical research involving animals.
14. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*. 2005; 9: 11-24.
15. Chemineau P, Daveau A, Cognie Y, Aumont G, Chesneau D. Seasonal ovulatory activity exists in tropical Creole female goats and Black Belly ewes subjected to a temperate photoperiod. *BMC Physiol*. 2004; 4: 12.
16. Chemineau P, Guillaume D, Migaud M, Thiery JC, Pellicer-Rubio MT, Malpaux B. Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod Domest Anim*. 2008; 43 Suppl 2: 40-47.
17. Chemineau P, Malpaux B, Delgadillo JA, Guérin Y, Ravault JP, Thimonier J, Pelletier J. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Anim Reprod Sci*. 1992: 157-184.
18. Chemineau P, Malpaux B, Pelletier J, Leboeuf B, Delgadillo JA, Deletang F, Pobel T, Brice G. Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. *INRA. Prod. Anim*. 1996; 9: 45-60.
19. da Silva TF, da Silva LD, Uchoa DC, Monteiro CL, de Aguiar Thomaz L. Sexual characteristics of domestic queens kept in a natural equatorial photoperiod. *Theriogenology*. 2006; 66: 1476-1481.
20. Delgadillo JA, Cortez ME, Duarte G, Chemineau P, Malpaux B. Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. *Reprod Nutr Dev*. 2004; 44: 183-193.
21. Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology*. 1991; 36: 755-770.
22. Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. *Reprod Nutr Dev*. 1993; 33: 609-617.
23. Farstad W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*. 2000; 53: 175-186.

24. Feldman E, Nelson R. Feline reproduction. En: Canine and feline endocrinology and reproduction. Philadelphia, W. B. Saunders, 1996, 741-768.
25. Forsberg M, Fougner JA, Hofmo PO, Madej M, Einarsson EJ. Photoperiodic regulation of reproduction in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). J Reprod Fertil. 1989; 87: 115-123.
26. Franca LR, Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). Biol Reprod. 2003; 68: 1554-1561.
27. Gimenez F, Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Dorna IV, de la Sota RL, Stornelli MA. Suppression of estrus in cats with melatonin implants. Theriogenology. 2009; 72: 493-9.
28. Goeritz F, Quest M, Wagener A, Fassbender M, Broich A, Hildebrandt TB, Hofmann RR, Blottner S. Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. Theriogenology. 2003; 59: 1487-1502.
29. Gomez-Brunet A, Santiago-Moreno J, del Campo A, Malpaux B, Chemineau P, Tortonese DJ, Gonzalez-Bulnes A, Lopez-Sebastian A. Endogenous circannual cycles of ovarian activity and changes in prolactin and melatonin secretion in wild and domestic female sheep maintained under a long-day photoperiod. Biol Reprod. 2008; 78: 552-562.
30. Graham LH, Swanson WF, Wildt DE, Brown JL. Influence of oral melatonin on natural and gonadotropin-induced ovarian function in the domestic cat. Theriogenology. 2004; 61: 1061-1076.
31. Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. J Reprod Fertil. 1990; 88: 343-352.
32. Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. J Androl. 1990; 11: 204-215.
33. Howles CM, Craigon J, Haynes NB. Long-term rhythms of testicular volume and plasma prolactin concentrations in rams reared for 3 years in constant photoperiod. J Reprod Fertil. 1982; 65: 439-446.
34. Hurni H. Daylength and breeding in the domestic cat. Lab Anim. 1981; 15: 229-233.

35. Jessup DA. The welfare of feral cats and wildlife. J Am Vet Med Assoc. 2004; 225: 1377-1383.
36. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. The Feline Estrous Cycle. En: Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia, Pennsylvania, W.B. Saunders Company, R. Kersey, 2001; 396-403.
37. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. Semen Collection and Evaluation in the Cat. En: Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia, W. B. Saunders Company, R. Kersey, 2001; 508- 520.
38. Johnstone I. Electroejaculation in the domestic cat. Aust Vet J. 1984; 61: 155-158.
39. Johnstone I, Bancroft BJ, McFarlane JR. Testosterone and androstenedione profiles in the blood of domestic tom-cats. Animal Reproduction Science. 1984; 7: 363-375.
40. Karsch FJ, Robinson JE, Woodfill CJ, Brown MB. Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for an endogenous reproductive rhythm. Biol Reprod. 1989; 41: 1034-1046.
41. Kirkpatrick J. Seasonal testosterone levels, testosterone clearance, and testicular weights in male domestic cats. Canadian Journal of Zoology. 1985; 63: 1285-1287.
42. Kirkwood RN, Forbes JM, Hughes PE. Influence of boar contact on attainment of puberty in gilts after removal of the olfactory bulbs. J Reprod Fertil. 1981; 61: 193-196.
43. Langford GA, Ainsworth L, Marcus GJ, Shrestha JN. Photoperiod entrainment of testosterone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin cycles in rams in relation to testis size and semen quality. Biol Reprod. 1987; 37: 489-499.
44. Legan SJ, Karsch FJ. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. Biol Reprod. 1980; 23: 1061-1068.
45. Leyva H, Addiego L, Stabenfeldt G. The effect of different photoperiods on plasma concentrations of melatonin, prolactin, and cortisol in the domestic cat. Endocrinology. 1984; 115: 1729-1736.

46. Leyva H, Madley T, Stabenfeldt GH. Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat. J Reprod Fertil Suppl. 1989; 39: 125-133.
47. Leyva H, Madley T, Stabenfeldt GH. Effect of melatonin on photoperiod responses, ovarian secretion of oestrogen, and coital responses in the domestic cat. J Reprod Fertil Suppl. 1989; 39: 135-142.
48. Lincoln GA, Ebling FJ. Effect of constant-release implants of melatonin on seasonal cycles in reproduction, prolactin secretion and moulting in rams. J Reprod Fertil. 1985; 73: 241-253.
49. Lincoln GA, Peet MJ, Cunningham RA. Seasonal and circadian changes in the episodic release of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in rams exposed to artificial photoperiods. J Endocrinol. 1977; 72: 337-349.
50. Malpaux B. Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. USA, Elsevier Inc., J. Neil, 2006, 2231-2282.
51. Malpaux B, Robinson JE, Wayne NL, Karsch FJ. Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. J Endocrinol. 1989; 122: 269-278.
52. Malpaux B, Thiery JC, Chemineau P. Melatonin and the seasonal control of reproduction. Reprod Nutr Dev. 1999; 39: 355-366.
53. Malpaux B, Viguie C, Skinner DC, Thiery JC, Chemineau P. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. Brain Res Bull. 1997; 44: 431-438.
54. Malpaux B, Viguie C, Thiery J, Chemineau P. Controle photopériodique de la reproduction. INRA Prod. Anim., 1996; 9: 9-27.
55. Martin GB, S.W W-B, Boukhliq R, Tjondronegoro S, Miller DW, Fisher JS, Hotzel MJ, Restall BJ, Adams N. Non-photoperiodic inputs into seasonal breeding in male ruminants. En: Perspectives in Comparative Endocrinology. Ottawa, Canada, National Research Council of Canada, K. G. Davey, R. E. Peter, S. S. Tobe, 1994, 574-585.
56. Martinez-Pastor F, Guerra C, Kaabi M, Garcia-Macias V, de Paz P, Alvarez M, Herraes P, Anel L. Season effect on genitalia and epididymal sperm from Iberian red deer, roe deer and Cantabrian chamois. Theriogenology. 2005; 63: 1857-1875.

57. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. J Reprod Fertil. 1992; 95: 755-763.
58. Michel C. Induction of oestrus in cats by photoperiodic manipulations and social stimuli. Lab Anim. 1993; 27: 278-280.
59. Munson L, Chassy LM, Asa C. Efficacy, safety and reversibility of bisdiamine as a male contraceptive in cats. Theriogenology. 2004; 62: 81-92.
60. Nagy P, Guillaume D, Daels P. Seasonality in mares. Anim Reprod Sci. 2000; 60-61: 245-262.
61. Novotny R, Cizek P, Vitasek R, Bartoskova A, Prinosilova P, Janosovska M. Reversible suppression of sexual activity in tomcats with deslorelin implants. Theriogenology. 2012; 78: 848-857.
62. O'Callaghan D, Donovan A, Sunderland SJ, Boland MP, Roche JF. Effect of the presence of male and female flockmates on reproductive activity in ewes. J Reprod Fertil. 1994; 100: 497-503.
63. Ortavant R, Bocquier F, Pelletier J, Ravault JP, Thimonier J, Volland-Nail P. Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. Aust J Biol Sci. 1988; 41: 69-85.
64. Pelletier J, Almeida G. Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. J Reprod Fertil Suppl. 1987; 34: 215-226.
65. Pineda MH, Dooley MP, Martin PA. Long-term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. Am J Vet Res. 1984; 45: 1038-1041.
66. Rekwot PI, Ogwu D, Oyedipe EO, Sekoni VO. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. Anim Reprod Sci. 2001; 65: 157-170.
67. Reyna JC, Nuñez Favre R, Savignone CA, Tittarelli CM, Stornelli MC, Guzzetti J, García Mitacek MC, Stornelli MA. Influencia del fotoperiodo sobre la cantidad de células claras y oscuras en el gato doméstico. IX Jornadas de divulgación técnico-científicas, Santa Fe, 2008.
68. Robertson SA. A review of feral cat control. J Feline Med Surg. 2008; 10: 366-375.
69. Robinson JE, Karsch FJ. Timing the breeding season of the ewe: what is the role of daylength? Reprod Nutr Dev. 1988; 28: 365-374.

70. Robledo MAM, Carneiro MP, Baratella-Evencio L, Envencio-Neto J. Avallacao do fotoperíodo na inducao do estro em gatas doméstica (*Felis catus*). Rev. Bras. Reprod. Anim. 2003; 27: 274-275.
71. Roelants H, Schneider F, Goritz F, Streich J, Blottner S. Seasonal changes of spermatogonial proliferation in roe deer, demonstrated by flow cytometric analysis of c-kit receptor, in relation to follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and testosterone. Biol Reprod. 2002; 66: 305-312.
72. Rollag MD, O'Callaghan PL, Niswender GD. Serum melatonin concentrations during different stages of the annual reproductive cycle in ewes. Biol Reprod. 1978; 18: 279-285.
73. SAS Institute Inc. SAS/C Compiler and Library User's Guide, Release 6.00, (4th edition), Cary, NC: SAS Institute Inc., 1996. 433 pp.
74. Savignone CA, Reyna JC, Stornelli MC, Tittarelli CM, Nuñez Favre R, García Mitacek MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Presencia de mucopolisacáridos en el epitelio epididimal del gato doméstico en diferentes épocas del año. XXIV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán, 2007, Libro de resúmenes, p.97, Tañ del Valle, Tucumán.
75. Schon J, Blottner S. Seasonal variations in the epididymis of the roe deer (*Capreolus capreolus*). Anim Reprod Sci. 2008; 159 (2-3): 257-263.
76. Schon J, Goritz F, Streich J, Blottner S. Histological organization of roe deer testis throughout the seasonal cycle: variable and constant components of tubular and interstitial compartment. Anat Embryol (Berl). 2004; 208: 151-9.
77. Slatter D. En: Textbook of small animal surgery (3rd edition), Philadelphia, W. Saunders, USA, 1993, 1325-1335.
78. Smith A, Bugge HP, Berg KA, Moller O, Hansson V. Seasonal changes in testicular structure and function in the blue fox (*Alopex lagopus*), as quantified by morphometric analysis and measurement of adenylate cyclase activity. Int J Androl. 1986; 9: 53-66.
79. Smith AJ, Clausen OP, Kirkhus B, Jahnsen T, Moller OM, Hansson V. Seasonal changes in spermatogenesis in the blue fox (*Alopex lagopus*), quantified by DNA flow cytometry and measurement of soluble Mn²⁺ -dependent adenylate cyclase activity. J Reprod Fertil. 1984; 72: 453-461.
80. Spindler RE, Wildt DE. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic Cat. Biol Reprod. 1999; 61: 188-194.

81. Stetson MH, Tate-Ostroff B. Hormonal regulation of the annual reproductive cycle of golden hamsters. Gen Comp Endocrinol. 1981; 45: 329-344.
82. Stetson MH, Watson-Whitmyre M, Matt KS. Termination of photorefractoriness in golden hamsters-photoperiodic requirements. J Exp Zool. 1977; 202: 81-88.
83. Stetson MH, Watson-Whitmyre M, Tate-Ostroff B. Role of the pineal and its hormone melatonin in the termination of photorefractoriness in golden hamsters. Biol Reprod. 1983; 29: 689-696.
84. Stornelli MA. Basic and advanced evaluation of cat's semen. Brazilian J. Anim. Reprod. 2007; 31: 135-140.
85. Stornelli MA, Gimenez F, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli C, Videla-Dorna I, De la Sota R. Efficacy of 18 and 36 mg subcutaneous melatonin implant to reversibly suppress estrus in queens. 16th International Congress of Animal Reproduction, 2008, Abstracts, p. 208, Budapest, Hungary.
86. Stornelli MA, Reyna JC, Stornelli MC, Nuñez Favre R, Savignone CA, Tittarelli CM, de la Sota RL. Seasonal changes in testicular cell morphology in domestic male cats (*Felis catus*). Reprod Domest Anim. 2009; 44 Suppl 2: 287-290.
87. Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli CM, Reyna JC, de la Sota RL. Influencia del fotoperiodo en la cantidad de espermatozoides epididimales en gatos. I Congreso y IV Jornada Nacional de Felinos, 2004, Libro de resúmenes, Corrientes, Argentina, p. 19-20.
88. Thibault C, Courot M, Martinet L, Mauleon P, du Mesnil du Buisson F, Ortavant R, Pelletier J, Signoret JP. Regulation of breeding season and estrous cycles by light and external stimuli in some mammals. J Anim Sci. 1966; 25: 119-142.
89. Thiery JC, Chemineau P, Hernandez X, Migaud M, Malpoux B. Neuroendocrine interactions and seasonality. Domest Anim Endocrinol. 2002; 23: 87-100.
90. Thimonier J. Control of seasonal reproduction in sheep and goats by light and hormones. J Reprod Fertil Suppl. 1981; 30: 33-45.
91. Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudin E, Stornelli MC, Stornelli MA, de la Sota RL. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. Theriogenology. 2006; 66: 1637-1640.
92. Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA, Stornelli MC, Desmarás E, de la Sota RL. Concentración y viabilidad de espermatozoides epididimales felinos en

diferentes épocas del año. VII Reunión Interamericana de Cátedras de Fisiología Animal, 2004, La Pampa. Argentina.

93. Tsutsui T, Murao I, Kawakami E, Ogasa A, Stabenfeldt GH. Androgen concentration in the blood and spermatogenic function of tom cats during the breeding season. Nippon Juigaku Zasshi. 1990; 52: 801-806.
94. Tsutsui T, Onodera F, Oba H, Mizutani T, Hori T. Plasma hormone levels and semen quality in male cats during non-breeding and breeding seasons. Reprod Domest Anim. 2009; 44 Suppl 2: 291-293.
95. Vandenbergh JG. Acceleration of sexual maturation in female rats by male stimulation. J Reprod Fertil. 1976; 46: 451-453.
96. Verstegen JP. Physiology and endocrinology of reproduction in female cats. En: Small animal reproduction and neonatology. Cheltenham, United Kingdom., G. E. Simpson, G. C. Harvey, M., 1998, p. 105-111.
97. Vieyetz M. La glándula pineal. En: Fisiología veterinaria. Nueva York, Interamericana McGraw-Hill, G. S. A, 1995, p. 696-706.
98. Wayne NL, Malpoux B, Karsch FJ. Photoperiodic requirements for timing onset and duration of the breeding season of the ewe: synchronization of an endogenous rhythm of reproduction. J Comp Physiol [A]. 1990; 166: 835-842.
99. Wildt DE, Bush M, Howard JG, O'Brien SJ, Meltzer D, Van Dyk A, Ebedes H, Brand DJ. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. Biol Reprod. 1983; 29: 1019-1025.
100. Zambelli D, Cunto M. Semen collection in cats: techniques and analysis. Theriogenology. 2006; 66: 159-165.

CAPÍTULO VII

BIOGRAFÍA PERSONAL

La Médica Veterinaria Romina Nuñez Favre nació en Capital Federal el 20 de julio de 1977. Realizó sus estudios secundarios en la Escuela de Educación Técnica N°2 “Canónigo Narciso Goiburú”, en Colón, Entre Ríos. Ingresó a la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la UNLP en marzo de 1997 y obtuvo el título de Médico Veterinario en marzo de 2003.

En el año 2006, ingresó como docente en la Cátedra y de Reproducción Animal en el área de Pequeños Animales, donde actualmente se desempeña como Ayudante Diplomado interino. En 2007, comenzó a desarrollar su actividad en investigación como integrante del Programa de Incentivos Docentes a la investigación. Incentivada por la incursión en la investigación científica, en el año 2008 comenzó a trabajar con una beca Doctoral de CONICET en el área de Reproducción de Pequeños Animales, área en la que desde entonces ha desarrollado tareas dictando numerosos cursos a profesionales y publicando varios trabajos científicos y de divulgación técnica. En el mismo año, comenzó a desarrollar su Tesis Doctoral en esta Facultad bajo la dirección de la Dra. María Alejandra Stornelli.

Una vez finalizada esta tesis, continuará con su labor de investigación en la Cátedra y el Servicio de Reproducción, con una beca Pos Doctoral de CONICET por dos años realizando un estudio sobre el efecto de implantes de GnRH para suprimir la espermatogénesis en el gato doméstico.