



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

TESIS DOCTORAL

MV. MARIANA LUCÍA LÓPEZ MERLO

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

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

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROGESTÁGENOS EN GATOS
DOMÉSTICOS INMADUROS**

AUTOR: Med. Vet. LÓPEZ MERLO, Mariana L.

DIRECTOR: Dra. GOBELLO, Cristina, DECAR

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

MIEMBROS DE JURADO: Dra. FERNÁNDEZ, Patricia

Dra. MANZUR, Teresita

Dra. WANKE, Magdalena

Año 2018

*A mi familia y a todas las personas que me acompañaron
para que esto sea posible...*

“Ten paciencia con todas las cosas,
pero sobre todo contigo mismo”

San Francisco de Asís

AGRADECIMIENTOS

- Mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral.
- A mi Directora, la Dra. Cristina Gobello, quien me dio la oportunidad de conocer el mundo de la investigación, y que, con gran dedicación y compromiso, me orientó en esta tarea.
- A mis padres, a mi hermano y a mis abuelos, por creer en mí, por su invaluable esfuerzo para brindarme la educación necesaria para llegar hasta acá. Por estar siempre conmigo.
- A Pablo, mi compañero de vida, mi amor. Por escucharme, aconsejarme y acompañarme en todo momento. Por su infinita paciencia.
- A mis compañeros de trabajo, Florencia, Rosario y Pablo por su colaboración, dedicación y buena predisposición, y muy especialmente a Anita, por hacer que las cosas siempre sean más fáciles y amenas, y porque en ella encontré a una amiga.
- A mis compañeros de la Cátedra de Métodos Complementarios de Diagnóstico, por brindarme un espacio agradable de trabajo y colaborar conmigo cada vez que lo necesito.
- A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, por brindarme de manera gratuita una formación académica de excelencia.
- A todos mis amigos, por ser una parte fundamental en mi vida.
- A Benito, a todas las mascotas que me acompañaron a lo largo de mi vida, por tanto amor. Y a todas las mascotas, participantes o no de esta Tesis, por hacer de éste un mundo más agradable.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

Publicaciones en revistas internacionales

- **López Merlo M**, Faya M, Blanco P, Carranza A, Barbeito C, Gobello C. Failure of a single dose of medroxyprogesterone acetate to induce uterine infertility in postnatally treated domestic cats. *Theriogenology*. 2016; 85: 718-723.
- **López Merlo M**, Faya M, Priotto M, Barbeito C, Gobello C. Development and proliferation of feline endometrial glands from fetal life to ovarian cyclicity. *Theriogenology*. 2017; 99: 119-123.

Presentaciones en congresos nacionales e internacionales

- **López Merlo M**, Ponchon T, Faya M, Batista P, Carranza A, Gobello C, Barbeito C. Effect of medroxiprogesterone acetate on the uterine adenogenesis of domestic carnivores. 1º Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal 2015, Capital Federal, Argentina.
- **López Merlo M**, Faya M, de la Sota P, Carranza A, Barbeito C, Gobello C. Postnatal exposure to a progestin does not prevent uterine adenogenesis in domestic cats. V Jornadas de Jóvenes investigadores “Ciencia y Sociedad”. Universidad Nacional de Buenos Aires, 2015, Capital Federal, Argentina.
- **López Merlo M**, Faya M, Priotto M, Marchetti C, Barbeito C, Gobello C. Uterine gland development from fetal life to puberty in the domestic cat. 20th EVSSAR Congress, 2017, Viena, Austria.
- **López Merlo Mariana**, Faya Marcela, Priotto Marcelo, Marchetti Cynthia, Barbeito Claudio, Arias Daniel, Gobello Cristina. Desarrollo y proliferación de las glándulas endometriales felinas desde la vida fetal hasta la pubertad. X Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica 2017, Mar del Plata, Argentina.

INDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
CAPÍTULO I	14
<i>Efecto de la administración neonatal de acetato de medroxiprogesterona en felinos domésticos hembras</i>	
CAPÍTULO II	29
<i>Efecto de la administración de acetato de medroxiprogesterona en felinos domésticos machos</i>	
CAPÍTULO III	45
<i>Adenogénesis uterina en felinos domésticos</i>	
CONCLUSIONES FINALES	58
PUBLICACIONES	60

ABREVIATURAS

AMP: acetato de medroxiprogesterona

PLC: placebo

sc: subcutánea

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

LH: hormona luteinizante

P₄: progesterona

17β-E₂: 17β-estradiol

T: testosterona

vs: versus

μm²: micrómetro cuadrado

μm: micrómetro

RIA: radioinmunoensayo

SEM: error estándar de la media

ANOVA: análisis de la varianza

pg: picogramo

ng: nanogramo

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROGESTÁGENOS EN GATOS DOMÉSTICOS INMADUROS

Palabras clave: felino, acetato de medroxiprogesterona, contracepción, posnatal

RESUMEN

En el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos: 1) Evaluar los efectos de la administración de un progestágeno de larga acción en la reproducción del gato doméstico, mediante evaluaciones clínicas, endocrinológicas e histológicas. 2) Describir el desarrollo de las glándulas uterinas desde el período prenatal hasta la pubertad en la misma especie. 1) Veinticuatro felinos neonatos fueron asignados a los siguientes tratamientos: acetato de medroxiprogesterona 10mg sc (AMP; n=12) o placebo (PLC; n=12). Se realizó el seguimiento hasta la pubertad, cuando se realizaron pruebas de fertilidad. Posteriormente los gatos fueron castrados para la evaluación histológica gonadal. 2) Veinticuatro úteros desde el último tercio de la gestación hasta la pubertad fueron evaluados histológicamente y se realizaron pruebas de inmunohistoquímica utilizando el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). 1) Siete gatas ovularon y quedaron preñadas (4/6 AMP y 3/4 PLC; $p>0,1$) y diez gatos resultaron fértiles (5/6 AMP y 5/6 PLC; $p>0,1$) sin diferencias en los tratamientos. Tampoco se observaron diferencias significativas en la histología gonadal entre los grupos ($p>0,1$). El área ocupada por glándulas y la altura del epitelio uterino de las gatas AMP no difirió del grupo PLC ($p>0,1$). Cuatro de las seis gatas AMP presentaron hiperplasia endometrial y 1/6 desarrolló una piometra. 2) Aunque los úteros prenatales no presentaron ninguna indicación de adenogénesis uterina se observó alta proliferación celular tanto del epitelio luminal como del estroma. La adenogénesis comenzó la semana 1 como una incipiente invaginación del epitelio luminal cilíndrico simple. Durante la semana 2 se incrementó la invaginación del epitelio hacia el estroma y fue posible observar un grado leve de tubulogénesis. De semana 3 a la 5 la tubulogénesis fue más marcada a lo largo del borde

del epitelio luminal y comenzaron a observarse cortes transversales de pequeñas glándulas rudimentarias por debajo del epitelio. De la semana 8 y hasta el final del estudio se observó un incremento en la profundidad y ramificaciones de las glándulas. Del presente estudio se concluye que el AMP no altera ni la histología ni la función reproductiva en esta especie y que la adenogénesis uterina comienza durante la primer semana de vida y finaliza de la quinta a la octava semana posnatal.

EFFECT OF PROGESTAGEN ADMINISTRATION IN IMMATURE DOMESTIC CATS

Key words: felid, medroxyprogesterone acetate, endocrine disruption, genital tract

SUMMARY

The aims of the present study were: 1) To evaluate the effects of a postnatal administration of a long term release progestin on domestic felid reproduction carrying out clinical, endocrine and histological evaluations. 2) To describe uterine gland development in this species. 1) Twenty-four postnatal kittens were assigned to: medroxyprogesterone acetate 10 mg sc (MPA; n = 12) or placebo (PLC; n = 12), followed up until the first mating and then ovariohysterectomized/orchidectomized for histological exam. 2) Twenty-four uteri from late gestation to 24 postnatal week were submitted for histological exam and quantification of proliferating cell nuclear antigen. 1) Seven queens ovulated (4/6 MPA and 3/4 PLC; $p>0.1$) and were pregnant ($p>0.1$). Five out of 6 and 5/6 males of the MPA and PLC groups were fertile, respectively ($p>0.1$). Neither gross nor microscopical significant differences were found for the gonads between groups ($p>0.1$). The MPA-treated queens revealed that the area occupied by uterine glands and the height of the glandular epithelium did not also differ ($p>0.1$). Four out of 6 MPA cats presented endometrial hyperplasia and 1/6 developed pyometra. 2) Although prenatal uteri presented no indication of adenogenesis it had high proliferation, 1 week old uteri revealed an incipient budding of the luminal epithelium. During the second week budding increased and a mild degree of tubulogenesis of the glandular epithelium into the stroma was detected. From the third to fifth weeks coiling, branching and cross-sections of glands appeared more evident. From the eighth week onwards, glandular epithelium penetrated through much of the stroma. It was concluded that MPA did not alter reproductive histology nor function in this species. Uterine adenogenesis commenced during the first postnatal week and concluded by postnatal weeks 5 to 8.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La fisiología reproductiva del gato doméstico (*Felis catus*) difiere ampliamente de la de otros animales domésticos. El gato doméstico ha sido tradicionalmente clasificado de acuerdo a su ciclo estral como poliéstrico estacional de fotoperíodo positivo (Griffin, 2001a; Hurni y col., 1981), es decir que la luz ejerce una acción estimulante en su ciclicidad sexual. El control del patrón reproductivo estacional está dado por la secreción de melatonina de la glándula pineal durante la oscuridad. Así, en especies de fotoperíodo positivo, la melatonina influye negativamente en la generación de pulsos de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) produciendo una retroalimentación negativa sobre el eje hipofisiario gonadal (Leyva y col., 1989). La estación reproductiva natural en felinos incluye, generalmente, la primavera y el verano, cuando las horas de luz por día aumentan. Sin embargo, cuando la hembra felina vive en latitudes templadas y ecuatoriales cicla durante todo el año pero con distinta frecuencia, siendo más alta en estaciones con luz creciente (da Silva y col., 2006; Faya y col., 2011).

La pubertad en esta especie se alcanza cuando ha ganado por lo menos el 75-80% de su peso corporal adulto, siendo de aproximadamente 2,3 a 3,2 kg para el caso de la hembra. Asimismo, el comienzo de la actividad ovárica está influenciado por varios factores, entre ellos el fotoperíodo, el estado nutricional y la raza. Si bien la función reproductiva se mantiene durante toda la vida, la eficiencia máxima de ésta se extiende desde los 1,5 a 7 años.

Durante la temporada reproductiva el ciclo de la gata consta de cuatro fases: proestro, estro e interestro. El proestro se define como el período en el que los machos son atraídos por la hembra no receptiva. Puede durar entre 3 horas y 3 días. Los signos clínicos en esta fase en general son poco manifiestos, consisten en vocalizaciones, fricciones de la cabeza y el cuello contra el propietario o contra objetos inanimados, atracción de machos pero rechazo a la cubrición, posturas de lordosis y giros sobre sí misma. La hormona foliculo estimulante (FSH) es la que mayormente induce el crecimiento folicular, característico de esta fase, con el consiguiente aumento de la síntesis de

estrógenos a una concentración mayor de 20 pg/ml de 17β estradiol. Algunas gatas no presentan proestro y alcanzan abruptamente una conducta de estro con receptividad al macho (Griffin, 2001a).

El estro se define como el período de apareamiento. Esta fase, por ende, sólo se reconoce por la conducta de la gata ante el macho. Puede durar entre 4 a 7 días con un rango entre 1 a 21 días. Durante este período la hembra permite ser cubierta por el macho. Los signos conductuales observados en el proestro se hacen más evidentes durante este momento. Si se palmea el lomo o se fricciona la base de la cola, la hembra adopta postura de lordosis desviando la cola hacia lateral (Concannon y col., 1980; Jemmett y col., 1977). Durante este período, la concentración de estrógenos aumenta considerablemente, superando los 50 pg/ml alrededor del quinto día de la fase folicular, luego descienden a concentraciones de 20-25 pg/ml hacia el día 7 y son inferiores a 20 pg/ml hacia el día 8 de la fase folicular, considerándose a este valor como el día 1 del interestro (Griffin, 2001a).

En la gata la ovulación es, mayormente, inducida. El principal mecanismo fisiológico para la ovulación es un arco reflejo vaginal-médula-hipotálamo en el que la estimulación de las cópulas conducen a la liberación de la GnRH y ésta induce, a su vez, la liberación de hormona luteinizante (LH) por la hipófisis. En esta especie existe también un 20-30 % de ovulaciones espontáneas. Las gatas en estro responden con elevación robusta y prolongada de LH cuando se las somete a múltiples apareamientos en un solo día. Algunas gatas permitirán hasta 36 cópulas dentro de un período de 36 horas y de 5 a 6 cópulas en las primeras 2 horas (Lawler y col., 1993). También se ha demostrado, con frecuencia variable, ovulaciones espontáneas cuando las hembras se alojan solas y en ausencia de machos (Gudermunth y col., 1997).

El interestro es el intervalo entre dos ciclos estrales durante la temporada reproductiva. La duración de esta fase varía considerablemente según se produzca o no ovulación. Si no se produce la ovulación este período puede durar entre 7 a 15 días. En este caso la hembra no presenta signos clínicos específicos y las concentraciones de estrógenos y progesterona (P_4) se encuentran basales. Si se produce la ovulación y la hembra no concibe, la duración de la fase de interestro total se alarga dando lugar a una fase lútea. En la gata, la fase lútea sin gestación se denomina pseudogestación, dura aproximadamente 35 días, y se caracteriza por el predominio de la P_4 proveniente de los cuerpos

lúteos. Alrededor del tercer día de iniciada la pseudogestación, los niveles de P_4 pueden elevarse a 5ng/ml, llegando a valores de 20 ng/ml hacia los días 16 a 25. A partir de este momento, las concentraciones de P_4 se tornan descendentes para llegar a valores basales hacia los 35 días. Durante la fase de pseudogestación la hembra felina generalmente no presenta signología de comportamiento sexual. Luego de 7 a 10 días de producirse la luteólisis, las hembras comienzan a ciclar nuevamente durante la estación reproductiva (Griffin, 2001a).

La gestación felina dura en promedio 63-67 días, considerando variaciones de 59 a 71 días (Root y col., 1995). Si los servicios se realizan durante varios días, la ovulación puede ocurrir en cualquiera de ellos ocasionando un alargamiento aparente de la gestación si se cuenta desde el primer día del servicio. La superfecundación es un fenómeno observado en gatas de vida libre y ocurre por la fertilización de óvulos de una hembra por espermatozoides de diferentes machos. Durante los 14 a 20 primeros días de gestación, la progesteronemia no arroja diferencias significativas con respecto a la que se observa en la gata pseudogestante. A partir del día 20, no sólo el cuerpo lúteo sintetiza la P_4 , sino que también comienza a hacerlo la placenta. A medida que los días transcurren, la síntesis de P_4 por la placenta se vuelve cada vez más importante a tal punto que la ovariectomía a partir del día 50 no interrumpe la gestación (Tsutsui y col., 2009). El anestro estacional es un período caracterizado por la ausencia de ciclos estrales. Esta fase ocurre fisiológicamente cuando disminuyen las horas de luz en otoño-invierno, con el consiguiente aumento de melatonina y prolactina (Verstegen, 1998).

En la especie felina la citología vaginal es un método utilizado como diagnóstico para evaluar el estadio del ciclo estral. En un extendido de células vaginales se pueden encontrar células parabasales, intermedias y superficiales dependiendo el tamaño y la forma de las mismas. Así, las gatas en celo presentan una citología vaginal con abundantes células superficiales que pueden ser nucleadas o anucleadas; las hembras en interestro presentan células epiteliales intermedias y ocasionalmente puede observarse la presencia de neutrófilos, finalmente en las que están en anestro hay células epiteliales intermedias y parabasales (Mills y col., 1979).

Los machos felinos alcanzan la pubertad con un peso corporal aproximado de 3,5 kg. Son fértiles durante todo el año, aunque la libido y la fertilidad se ven atenuadas durante los meses con menos

horas de luz (Schmidt, 1986). Los gatos machos nacen con los testículos descendidos en las bolsas escrotales. La barrera hematotesticular y la presencia de células de Leydig maduras se establecen durante el período de la pubertad (Sanchez y col., 1993) y el ciclo espermático tiene una duración de 46,8 días (França y Godinho, 2003). El pene del gato está cubierto por 100-200 espículas cornificadas y curvas, de 1mm de largo, que se dirigen hacia la base del pene (Feldman y Nelson, 2000). Estas espículas se desarrollan en la peripubertad y estimulan la liberación de LH pituitaria en la hembra (Aronson y Cooper, 1967). En los machos de esta especie la separación balano prepucial y la presencia de espículas demuestran el grado de desarrollo sexual (Johnston y col., 2001).

El control de la reproducción indeseada en los felinos domésticos es un problema más severo que el de los caninos (ACCD 2002, 2004), ya que son sumamente prolíficos (Griffin, 2001b). La sobrepoblación felina mundial y las malas condiciones en que viven muchos de estos animales, afectan no solo a ellos, sino también a la salud de los seres humanos. Esta sobrepoblación de mascotas es preocupante desde dos puntos de vista: el de la salud pública y el humanitario (Munson y col. 2006).

Si bien existen distintos métodos (quirúrgico, hormonal, inmunológico, químico), no se ha encontrado el método óptimo para el control de la reproducción indeseada de forma irreversible en esta especie (Goericke y Pesch, 2010). Los lineamientos internacionales para abordar el problema apuntan a que el contraceptivo ideal debe ser: eficiente, seguro, no quirúrgico, aplicable en una única dosis a ambos géneros, además de tener un costo razonable. El descubrimiento de un método de esterilización con estas características beneficiaría tanto a los animales como a la sociedad.

El incremento de las hormonas gonadales durante el período perinatal es un fenómeno fisiológico que ocurre en la mayoría de los mamíferos (Gore, 2008). Este aumento se debe al desbloqueo del eje hipotálamo hipofisiario gonadal del postnato producido por la elevada concentración de hormonas maternas durante la gestación (Burger y col., 1991; Corbier y col., 1992; Herath y col., 2001). Luego de este período, los esteroides gonadales declinan lentamente hasta los valores basales típicos de los animales prepúberes (Kolho y Huhtaniemi, 1989). En roedores postnatos, estas concentraciones elevadas de hormonas sexuales plasma los patrones de diferenciación sexual del sistema nervioso central, la fisiología reproductiva y el comportamiento, así como también el desarrollo y la madurez

del sistema reproductivo e inmune (Kolho y Huhtaniemi, 1989). Existe, por lo tanto, un período crítico de vulnerabilidad en esta etapa (Quigley y col., 2002).

El período preciso de desarrollo reproductivo es específico de especie y depende del estado de madurez de cada especie al momento del nacimiento (Gorski, 1985). Así, los carnívoros domésticos nacen con un estado de madurez inferior al del resto de las especies domésticas. En los felinos domésticos el período crítico de vulnerabilidad se extendería desde la semana 1 hasta la semana 4 posnatal, donde se encontró un aumento significativo de los esteroides sexuales seguido de una notable disminución (Faya y col., 2013). Si durante esta ventana de tiempo se producen exposiciones a agentes hormonales exógenos (e.d. disruptores) endocrinos, éstos podrían afectar el potencial reproductivo del adulto (Pryor y col., 2000). Un disruptor endocrino es una sustancia exógena, con efectos deletéreos en las funciones hormonales de un individuo o de sus descendientes, debido a cambios en la función endócrina (Cravedi y col., 2007).

Tomando como ventaja el estado de inmadurez con el que nacen los carnívoros domésticos, se han utilizado diferentes disruptores hormonales posnatales en felinos. La disrupción endocrina con un agonista de GnRH de larga duración durante la ventana crítica posnatal disminuyó las hormonas sexuales fecales y causó un deterioro reproductivo, obteniendo un 30% de animales infértiles y postergando la pubertad (Carranza y col., 2014, 2015). La administración de una dosis suprafisiológica de testosterona en hembras felinas neonatas también produjo anovulación y anormalidades histológicas en el tracto reproductivo (Demaldé y col., 2016). Hasta el momento, no existen estudios en felinos con progestágenos durante el período crítico del desarrollo sexual posnatal con fines contraceptivos. Los progestágenos son derivados sintéticos de la progesterona utilizados tradicionalmente para la supresión de los ciclos ováricos en hembras adultas por su acción anti-gonadotrópica (Concannon y col., 1991). Así, el acetato de medroxiprogesterona, un progestágeno económico, potente, de larga acción y ampliamente disponible en el mercado (Romagnoli & Concannon, 2003), fue seleccionado como disruptor endocrino para este estudio.

En base a lo descripto anteriormente, el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral fue contribuir al control de la reproducción indeseada en felinos domésticos mediante objetivos específicos que se desarrollarán en sus respectivos Capítulos.

Referencias

1. Alliance for Contraception in Cats and Dogs (ACCD). Proceedings Book of the International Symposium of Non Surgical Methods for Pet Population Control. Georgia, USA 2002; Pp 110.
2. Alliance for Contraception in Cats and Dogs (ACCD). Proceedings Book of the 2nd International Symposium of Non Surgical Methods for Pet Population Control. Colorado, USA 2004; Pp 204.
3. Aronson L, Cooper M. Penile spines of the domestic cat: their endocrine-behavior relations. *Anat. Rec.* 1967; 157: 71-8.
4. Burger H, Yamada Y, Bangah M, Mc Cloud P, Warne G. Serum gonadotropin, sex steroid, and immunoreactive inhibin levels in the first two years of life. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 72: 682-6.
5. Carranza A, Faya M, Lopez Merlo M, Batista P, Gobello C. Effect of GnRH analogs in postnatal domestic cats. *Theriogenology.* 2014; 82: 138-43.
6. Carranza A, Faya M, Fernández P, Barbeito C, Gobello C. Histologic effect of a postnatal slow-release GnRH agonist on feline gonads. *Theriogenology.* 2015; 83: 1368-72.
7. Concannon P, Hodgson B, Lein D. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. *Biology of Reproduction* 1980; 23:111-7.
8. Concannon PW and Meyers-Wallen VN. Current and proposed methods for contraception and termination of pregnancy in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 198: 1214-25.

9. Corbier P, Edwards D, Roffi J. The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*. 1992; 100: 127-31.
10. Cravedi JP, Zalko D, Savouret JF, Menuet A, Jégou B. The concept of endocrine disruption and human health. *Med Sci*. 2007; 23: 198-204.
11. 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: 1476-81.
12. Demaldé L, López Merlo M, Vercellini R, Barbeito CG, Fernández P, Gobello C. Disrupting effect of androgens in postnatal female domestic cats. *Anim Reprod Sci* 2016; 171: 65-71.
13. Faya M, Carranza A, Priotto M, Abeya M, Diaz J, Gobello C. Domestic queens under natural temperate photoperiod do not manifest seasonal anestrus. *Anim Reprod Sci*. 2011; 129: 78-81.
14. Faya M, Carranza A, Miotti R, Ponchón T, Furlan P, Gobello C. Fecal estradiol 17-b and testosterone in prepubertal domestic cats. *Theriogenology* 2013; 80: 584-6.
15. Feldman E, Nelson R. Reproducción de gatos. *Endocrinología y Reproducción en Perros y Gatos*. 2da ed. México: McGraw-Hill Interamericana 2000; p. 806.
16. França L, Godinho C. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod*. 2003; 68: 1554-61.
17. Goericke-Pesch S. Reproduction control in cats: new developments in non surgical methods. *J Feline Med Surg* 2010; 12: 539-46.
18. Gore A. Developmental programming an endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*. 2008; 29: 358-74.
19. Gorski R. Sexual differentiation of the brain: possible mechanisms and implications. *Can J Physiol Pharmacol*. 1985; 63: 577-94.
20. Griffin B. Prolific Cats: The Estrous Cycle. *Compendium* 2001a; 23: 1049-57.
21. Griffin B. Prolific cats: the impact of their fertility on the welfare of the species. *Comp Contin Edu Pract Vet*. 2001b; 23: 1058-69.

22. Gudermunth D, Newton L, Deals P, Concannon P. Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and fecal concentration of progesterone. *J Reprod Fert.* 1997; 51: 177-84.
23. Herath C, Yamashita M, Watanabe G, Jin W, Tangtrongsup S, Kojima A, Groome N, Suzuki A, Taya K. Regulation of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol and dimeric inhibins in the infantile female rat. *Biol Reprod.* 2001; 65: 1623-33.
24. Hurni H. Daylength and breeding in the domestic cat. *Laboratory Animals* 1981; 15: 229-33.
25. Jemmett JE, Evans JM. A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. *Journal of Small Animal Practice.* 1977; 18: 31-7.
26. Johnston S, Root-Kustritz M, Olson P. Prevention and termination of feline pregnancy. En: *Canine and Feline Theriogenology.* Philadelphia, USA, Ed. Saunders, WB, 2001, p. 447-52.
27. Kolho K, Huhtaniemi I. Suppression of pituitary-testis function in rats treated neonatally with a gonadotrophin-releasing hormone agonist and antagonist: acute and long-term effects. *J Endocrinol.* 1989; 123: 83-91.
28. Lawler D, Johnston S, Hegstad R, Keltner D, Owens S. Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. *J Reprod Fert.* 1993; 47: 57-61.
29. 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.* 1989; 39: 125-33.
30. Mills J, Valli V, Lumsden J. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *CanVet J.* 1979; 20: 95-101.
31. Munson Linda. Contraception in felids. *Theriogenology* 2006; 66: 126-34.
32. Pryor J, Hughes C, Foster W, Hales B, Robaire B. Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. *Environ Health Perspect.* 2000; 108: 491-03.
33. Quigley C. The postnatal gonadotropin and sex steroid surge-insights from the androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87: 24-8.

34. Romagnoli S, Concannon PW. 2003. Clinical use of progestins. En: Bitches And Queens: A Review. En: Concannon PW., England G., Verstegen J., Linde-Forsberg C. (Eds.). Recent advances in small animal reproduction. International Veterinary Service, University of Cornell. 2003.
35. Root MV, Johnston SD, Olson PN. Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1995; 31: 429-33.
36. Sánchez B, Pizarro M, García P, Flores J. Histological study of Leydig cells in the cat from birth to sexual maturity. *J Reprod Fert.* 1993; 47: 349-53.
37. Schmidt P. Feline breeding management. *Small Anm Pract.* 1986; 16: 435-51.
38. Tsutsui T, Suzuki Y, Toyonaga M, Oba H, Mizutani T, Hori T. The role of the ovary for the maintenance of pregnancy in cats. *Reproduction in Domestic Animals* 2009; 2:120-4.
39. Verstegen J. Physiology and endocrinology of reproduction in female cats. En: Simpson, England, Harvey. *Manual of small animal reproduction and neonatology.* Cheltenham, UK, British Small Animal Veterinary Association, 1998, p. 11-6.

CAPITULO I

EFEECTO DE LA ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA EN FELINOS DOMÉSTICOS HEMBRAS

Introducción

En mamíferos como ovejas, cerdas, perras y roedores, el útero no se encuentra totalmente desarrollado al momento del nacimiento, siendo el desarrollo de las glándulas uterinas un evento posnatal (Gray y col., 2001a; Cooke y col. 2013). El útero canino comienza la adenogénesis durante la primer semana de vida y finaliza entre la semana 6 y la 8 posnatal (Cooke y col., 2012a). Aunque esta información no se encuentra disponible para los felinos domésticos, al ser ambas especies altriciales con muchas similitudes desde el punto de vista reproductivo, se podría asumir que la adenogénesis en los felinos ocurre en un período similar.

En los mamíferos euterios la adenogénesis endometrial implica la diferenciación del epitelio luminal y glandular, seguido de una invaginación tubular y ramificaciones a través del estroma uterino hacia el miometrio. La disrupción del desarrollo uterino durante períodos críticos pueden alterar la capacidad funcional del útero adulto y producir pérdidas embrionarias (Gray y col., 2001b; Cooke y col., 2013; Spencer y col., 2004). En estos mamíferos, los productos de secreción uterina por parte de las glándulas endometriales son necesarios para el establecimiento de la receptividad del útero y la implantación del concepto (Gray y col., 2001b). De esta forma, las alteraciones organizacionales de la arquitectura uterina durante la adenogénesis inducen infertilidad en el animal adulto, debido a que si bien el blastocisto eclosiona normalmente, fallan su supervivencia y elongación (Gray y col., 2001b). La exposición del tracto urogenital en desarrollo a esteroides, puede afectar la estructura y función de esos tejidos en el animal adulto y comprometer la eficiencia reproductiva (Bartol y col., 1995). Particularmente, el tratamiento neonatal con progesterona o progestágenos en ovejas y ratones produjo

la inhibición en el desarrollo de las glándulas uterinas, llevando a estos animales a la infertilidad (Gray y col., 2001c; Cooke y col., 2012b). Esto sugiere que un enfoque de este tipo podría proporcionar una estrategia contraceptiva permanente en animales de compañía.

Para probar la hipótesis de que la administración de progestágenos en la etapa crítica de desarrollo posnatal induce esterilidad en gatos domésticos, en el presente capítulo se plantearon los siguientes objetivos: (1) reportar la adenogénesis en felinos durante la primera semana de vida, (2) describir el efecto clínico, endocrinológico e histológico de la administración neonatal de un progestágeno en la reproducción de hembras felinas y (3) probar la seguridad clínica del tratamiento. El acetato de medroxiprogesterona (AMP), un progestágeno económico, potente y de larga acción (Romagnoli & Concannon 2003), fue seleccionado como disruptor endocrino para este estudio.

Materiales y métodos

Animales

Experimento 1

Para el estudio de la adenogénesis uterina en el período posnatal temprano, se utilizaron 3 hembras felinas nacidas en nuestra colonia experimental, las cuales murieron debido a causas traumáticas entre los 6 y los 8 días de vida.

Experimento 2

En este trabajo se utilizaron 12 hembras felinas neonatas, hermanas de camada, nacidas en nuestra colonia experimental. Los animales fueron expuestos a un fotoperíodo positivo de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad y, a partir de los 40 días de vida, fueron destetados y alimentados con alimento balanceado para cachorros y agua *ad libitum*. Todas las hembras se alojaron sueltas en habitaciones de 3 x 4 metros, con enriquecimiento ambiental para su distracción. Además, las gatas fueron

socializadas por alumnos entrenados. Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Uso y Cuidado Animal (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina y todos los experimentos fueron conducidos bajo las guías establecidas por The Guide for The Care and Use of Laboratory Animals, USA.

Diseño experimental y protocolo farmacológico

Las hembras se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos, dentro de las primeras 24 hs de vida:

- Acetato de medroxiprogesterona 10 mg/animal (0,2 ml/100 g; Singestar MP®, Konig, Argentina), subcutáneo (AMP; n=6).
- Placebo 0,2 ml/100 g de solución salina subcutánea (PLC; n=6).

***Nota:** La dosis fue seleccionada de acuerdo a Romagnoli & Concannon (2003).

Seguimiento

Se realizó el seguimiento de los animales hasta la aparición de los primeros signos clínicos de pubertad. Las gatas se observaron diariamente durante un mínimo de 2 horas a fin de detectar la aparición del comportamiento sexual típico y/o la presencia de algún efecto clínico adverso. Adicionalmente, se pesaron todos los animales una vez por semana para evaluar eventuales alteraciones del crecimiento relacionadas a los tratamientos.

Citologías vaginales

Se realizaron citologías vaginales tres veces por semana mediante hisopos óticos embebidos en solución fisiológica a partir de los 3 meses de edad. Los frotis se tiñeron con Tinción 15 (Biopur®, Sta Fe, Argentina) y se analizaron e interpretaron de acuerdo a Mills y col. (1979).

La pubertad se definió como la aparición del comportamiento sexual típico acompañado por la presencia de más del 80% de células superficiales queratinizadas en las citologías vaginales de las hembras (Johnston y col., 2001).

Recolección de materia fecal, extracción húmeda de 17 β -estradiol fecal y determinaciones hormonales

Las muestras de materia fecal para la medición de 17 β -estradiol (17 β -E₂) fueron tomadas semanalmente durante los 3 primeros meses de edad. Durante las primeras 5 semanas de vida fue necesario realizar estimulación rectal para su obtención. Los animales de mayor edad fueron encerrados en gateras individuales con alimento y agua hasta su defecación. Una vez obtenidas las muestras, fueron congeladas a -20 °C hasta su procesamiento.

El procesamiento de la materia fecal se realizó a través del método descrito por Brown y col. (2008) con algunas modificaciones realizadas por Risso y col. (2010 a,b). Brevemente, las muestras fueron homogeneizadas, luego se tomó de cada una una alícuota de 250 mg, a las que se les agregó 5 ml de alcohol étlico absoluto, y se las agitó primero a mano y después con vórtex por un minuto. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos, se separó el sobrenadante y se extrajeron 200 μ l que se colocaron en un ependorf para dejarlo evaporar hasta su sequedad. El residuo seco fue resuspendido en 200 μ l de buffer de esteroides para su posterior medición. Finalmente, los metabolitos fecales fueron determinados por electroquimioluminiscencia (Elecsys Estradiol II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Los resultados se expresaron en valores de peso húmedo (ng/g).

Pruebas de fertilidad in vivo

Cuando las gatas alcanzaron la pubertad fueron expuestas para su monta a gatos machos fértiles durante todo el período estral. Se observaron los apareamientos o se diagnosticaron por la presencia de los espermatozoides en las citologías vaginales. Veinticuatro días después de finalizado el estro se tomaron muestras de sangre para determinación de ovulación, la cual se llevó a cabo mediante la medición de P₄ sérica por electroquimioluminiscencia (Elecsys Progesterona II, Roche Diagnostics,

Mannheim, Germany; $P_4 > 5\text{ng/ml}$) y treinta días más tarde se realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonografía (Mattoon & Nyland 1995).

Ovariohisterectomías

Después del diagnóstico de gestación todas las hembras fueron ovariohisterectomizadas (Arnold, 2002) para la evaluación macroscópica e histológica de las gónadas y el útero y posteriormente las gatas fueron dadas en adopción.

Examen macroscópico e histológico de los ovarios y útero

Inmediatamente después de las cirugías, las gónadas y el útero fueron medidos (largo y ancho; cm), pesados (g), se calculó el volumen (cm^3 ; Chen y col., 2008; Lin y col., 2009) y el índice gonadosomático (%; França y Godinho, 2003).

Los ovarios se seccionaron longitudinalmente y se colocaron en el fijador de Bouin 12 horas, luego en formol al 10% 48 horas y finalmente en alcohol 70 grados hasta ser procesadas con el procedimiento de rutina en parafina. Se obtuvieron cortes seriados de $5\ \mu\text{m}$ que fueron montados, desparafinados en xylol y rehidratados con soluciones graduadas de etanol y finalmente teñidas con hematoxilina y eosina.

Los folículos se clasificaron bajo el sistema propuesto por Bristol-Gould y Woodruff (2006) en primordiales (ovocito pequeño rodeado por una capa simple de epitelio plano), primarios (ovocito más grande rodeado por una capa de epitelio cúbico), secundarios (2 o más capas de células de la granulosa y teca), antrales (espacio antral con fluido folicular, células de la granulosa formando un muro, *cúmulus oophorus* y dos o más capas de células tecales) o atrésicos (degeneración de las células de la granulosa, el líquido folicular con detrito celular, formación de vacuolas en el interior del ovocito; van Wezel y col., 1999; Hernandez y col., 2010). Se tomaron 20 imágenes con un aumento de 20X por ovario y se determinó el número de folículos primordiales, primarios, secundarios y antrales, de cuerpos lúteos y de folículos atrésicos por milímetro cuadrado (Reggiani y col., 2012).

Los úteros se seccionaron longitudinalmente para su inspección interna. Se cortaron secciones transversas (de 0,5-1 cm aproximadamente) que fueron tomadas en un punto medio entre la bifurcación y el extremo de cada cuerno uterino, se colocaron en formol al 10% durante 48 hs y luego se pasaron a alcohol 70 grados para su fijación y posterior procesamiento en parafina. Después de su procesamiento, se cortaron secciones de 5 μm y se tiñeron con hematoxilina eosina.

Los úteros se clasificaron histológicamente de acuerdo a la presencia o ausencia de las glándulas endometriales. Se calculó el área ocupada por glándulas por μm cuadrado de endometrio por planimetría. La altura del epitelio uterino se midió contando 100 células en un total de 10 fotos por útero con un objetivo de 10X.

Las imágenes histológicas se obtuvieron desde un microscopio óptico (Olympus BX50, Tokio, Japón) con los objetivos de 10X, 20X y 40X, a través de una cámara de video conectada (Sony DXC 151, Tokio, Japón) y digitalizadas en formato TIFF color de 24 bits. Las imágenes se analizaron a través del software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).

Análisis estadístico

Se compararon las variables de respuesta cualitativas y cuantitativas entre los grupos AMP y PLC a través de un Fisher exact test y test de Student, respectivamente. Las concentraciones de $17\beta\text{-E}_2$ se analizaron mediante un ANOVA de medidas repetidas en el tiempo seguido del test de Tuckey. Todos los datos se expresaron como la media \pm SEM y se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

Resultados

Experimento 1

Todas las gatas de 6 a 8 días de vida presentaron un estadio inicial de desarrollo glandular, evidenciado por invaginaciones del epitelio luminal hacia el estroma subyacente (**Figura 1**).

Experimento 2

No se encontraron diferencias entre los grupos AMP y PLC ni en la media de la edad a la pubertad ($43,7 \pm 5,9$ vs. $35,3 \pm 5,8$ semanas; $p > 0,05$), ni en el peso corporal a la pubertad ($2760,1 \pm 331,5$ vs. $2720,0 \pm 153,9$ g; $p > 0,1$; **Figura 2**). Cinco de seis hembras AMP presentaron labios vulvares redondeados con agrandamiento y exposición transitoria del clítoris, que comenzó a partir de la semana 5 y se normalizó gradualmente a la semana 20.

Todas las hembras mostraron comportamiento sexual normal ($p > 0,1$) y cuando fueron expuestas a machos fértiles durante el estro aceptaron los apareamientos.

La ovulación ocurrió en 4 de 6 hembras tratadas con AMP y en 5 de 6 hembras PLC ($p > 0,1$). Las 9 hembras que ovularon demostraron ser fértiles quedando preñadas luego de los servicios, no habiendo diferencias entre los tratamientos ($p > 0,1$).

No se observaron efectos colaterales permanentes, excepto en una gata tratada con AMP que desencadenó una piómetra a cuello abierto luego del diagnóstico de gestación y justo antes de que se lleve a cabo la ovariectomía.

No se encontraron diferencias entre los grupos en las concentraciones fecales de 17β -E₂ durante el período de seguimiento ($p > 0,1$; **Figura 3**), aunque si se observaron diferencias entre las semanas en ambos tratamientos ($p < 0,01$). La primera semana presentó concentraciones de 17β -E₂ más altas que el resto ($p < 0,01$) y a partir de ese momento esta hormona descendió rápidamente para mantener concentraciones basales hasta el final del muestreo fecal.

En la evaluación macro y microscópica de los ovarios no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de los parámetros estudiados (**Tabla 1 y 2**). La evaluación macroscópica de los úteros reveló una hiperplasia endometrial con engrosamiento e irregularidad del endometrio, en 4 de 6 hembras tratadas con AMP, una de las cuales desarrolló la piómetra a cuello abierto anteriormente mencionada. En estas 4 gatas tratadas con AMP se encontraron vesículas embrionarias con fetos viables. Ninguna de las hembras PLC presentó anomalías uterinas macroscópicas.

Con respecto al peso uterino, no se encontraron diferencias entre los grupos (AMP $3,86 \pm 1,1$ vs. PLC $4,10 \pm 1,9$ g; $p > 0,1$).

En la evaluación microscópica del útero de las hembras tratadas con AMP respecto de las PLC no se observaron diferencias significativas ni en el área ocupada por glándulas por μm^2 de endometrio ($0,55 \pm 0,2$ vs. $0,49 \pm 0,2$; $p>0,1$) ni en la altura del epitelio uterino ($24,5 \pm 6,7$ vs. $24,4 \pm 7,2 \mu\text{m}$; $p>0,1$). Se confirmó la presencia de hiperplasia endometrial quística en 4 de 6 hembras tratadas con AMP.

Figura 1: Útero de las gatas de 1 semana de vida. Nótese las invaginaciones del epitelio luminal hacia el estroma. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina (10X).

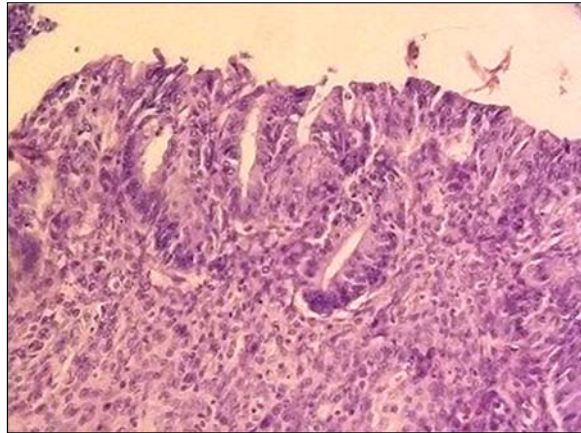


Figura 2: Peso (media \pm SEM) de hembras felinas tratadas posnatalmente (Día 0) con acetato de medroxiprogesterona 10 mg/animal (AMP; n=6) o placebo (PLC; n=6) y seguidas hasta la aparición de los primeros signos de pubertad. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

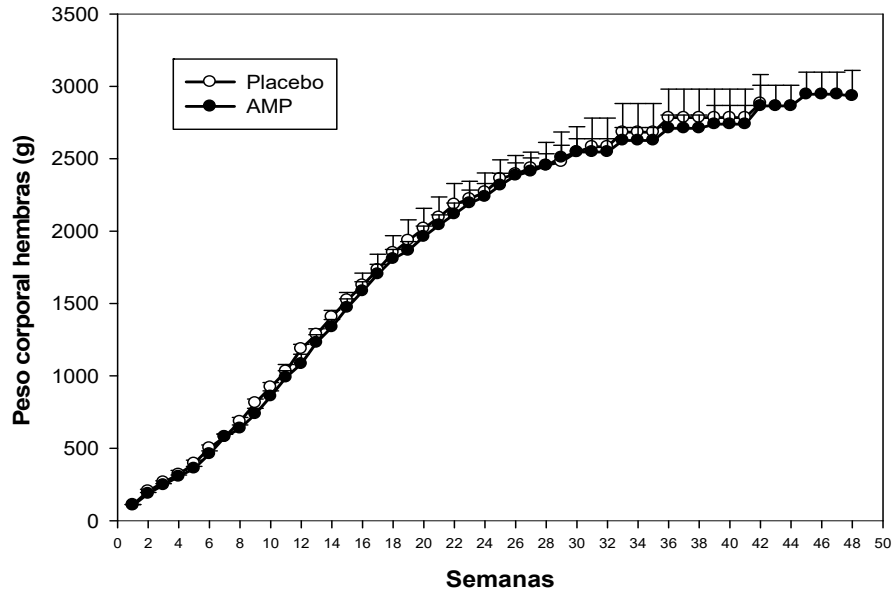


Figura 3: Concentración de estradiol fecal (media \pm SEM) de las hembras de la Figura 2. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,1$) y la primer semana presentó concentraciones superiores al resto en ambos tratamientos ($p<0,01$).

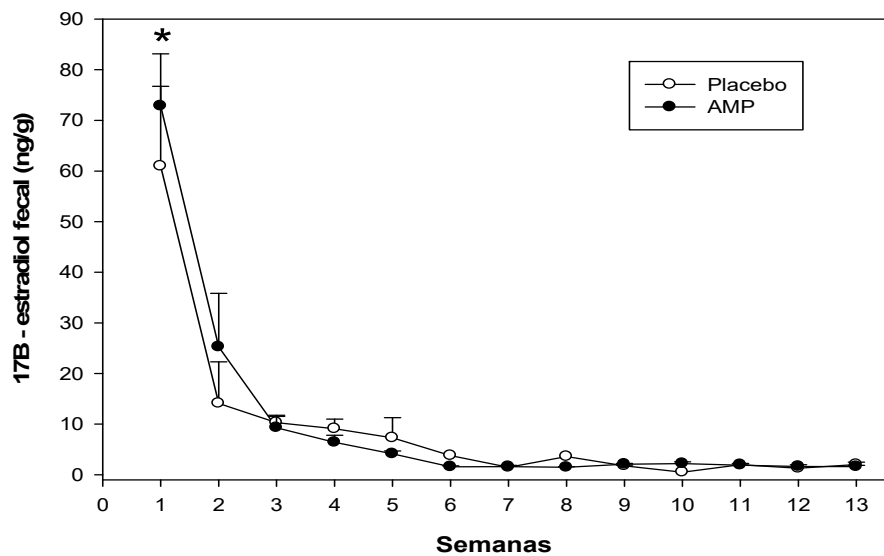


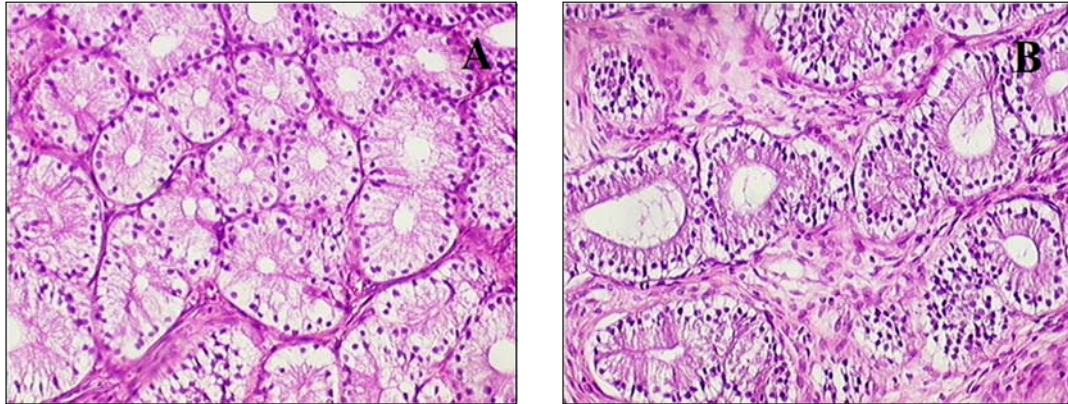
Tabla 1: Parámetros ováricos macroscópicos (media \pm SEM) de hembras felinas de la Figura 2 y ovariectomizadas después de los primeros signos de pubertad. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de los parámetros estudiados ($p>0,1$).

Parámetro	AMP	Placebo
Largo ovárico (cm)	0,95 \pm 0,02	0,95 \pm 0,03
Alto ovárico (cm)	0,75 \pm 0,08	0,63 \pm 0,02
Peso ovárico (g)	0,19 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01
Volumen (cm ³)	0,3 \pm 0,07	0,2 \pm 0,01

Tabla 2: Estructura histológica de los ovarios (media \pm SEM) de las hembras de la Figura 2. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de los parámetros estudiados ($p>0,1$).

Estructuras (mm ²)	AMP	Placebo
Folículos primordiales	216,83 \pm 12,71	216,5 \pm 16,65
Folículos primarios	6,99 \pm 1,15	7,64 \pm 1,06
Folículos secundarios	0,8 \pm 0,12	0,53 \pm 0,11
Folículos antrales	0,1 \pm 0,06	0,11 \pm 0,07
Cuerpos lúteos	0,31 \pm 0,03	0,34 \pm 0,11
Folículos atrésicos	17,33 \pm 1,97	14,5 \pm 3,54

Figura 4: Cortes histológicos de úteros de las gatas tratadas con AMP (A) y PLC (B). Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina (10X).



Discusión

Se ha descrito en varias especies, principalmente roedores y primates, que la disrupción endócrina durante el período crítico posnatal del desarrollo produce una serie de cambios irreversibles en el desarrollo gonadal tanto en hembras como en machos (Kezele y Skinner, 2003; Pryor y col., 2000). Estudios previos apoyan la investigación del potencial uso de progestágenos para contracepción en pequeños animales (Cooke y col., 2012a; Gray y col., 2000).

Este es el primer estudio que reporta la adenogénesis uterina durante la primera semana de vida y el efecto de una dosis suprafisiológica de un progestágeno potente y de larga acción sobre el desarrollo de las glándulas uterinas en felinos domésticos.

Al igual de lo que se observó en perras, otro carnívoro altricial con similar duración de la gestación, las gatas presentaron un incipiente estadio de desarrollo glandular hacia el final de la primera semana de vida. El hallazgo de un endometrio inmaduro destaca la importancia de probar el efecto de los

progestágenos en el período posnatal con fines contraceptivos en felinos. Para este propósito, en el presente estudio, se utilizó una dosis única de acetato de medroxiprogesterona administrada durante las primeras 24 horas de vida. Como este progestágeno es conocido por suprimir el eje gonadal por un mínimo de 3 semanas y, asumiendo que los gatos no son una excepción entre los mamíferos, todo el período de desarrollo glandular debería estar cubierto con este único tratamiento.

El tratamiento temprano con progestágenos no afectó ni la edad ni el peso corporal a la pubertad, con lo cual se puede inferir que no hubo alteraciones en el crecimiento corporal relacionadas con la administración del fármaco.

Los labios vulvares redondeados con agrandamiento y exposición transitoria del clítoris encontrados en este estudio, pueden deberse a los efectos androgénicos de los progestágenos (Romagnoli y Concannon, 2003). En contraste a lo que se había reportado con la administración de otros esteroides en roedores y caninos (Gogan y col., 1980; Beach y col., 1983), los progestágenos no modificaron ni el comportamiento sexual ni la libido durante el estro.

La funcionalidad del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal aparentemente no se vio afectada por el progestágeno, ya que no se hallaron diferencias significativas en las concentraciones fecales de 17β -E₂ durante el período de seguimiento. Los valores más elevados de 17β -E₂ encontrados durante la primera semana de vida son coincidentes con los previamente descritos en felinos posnatales (Faya y col. 2013).

La anovulación diagnosticada en 2 de las gatas tratadas con AMP y en una de las gatas PLC, pudo deberse a la fisiología normal del ciclo reproductivo de la hembra felina que se clasifica tradicionalmente como de ovulación inducida.

El tratamiento neonatal con acetato de medroxiprogesterona no alteró la adenogénesis uterina, ya que no se evidenció en la evaluación histológica una reducción ni en el área ocupada por glándulas ni en la altura del epitelio uterino. El hecho de que todas las hembras AMP que ovularon hayan quedado preñadas confirma la falla en la inducción de infertilidad uterina en estos felinos. Estos resultados se contraponen con lo descrito para otras especies, como ovinos y ratones, en los cuales el tratamiento

con progestágenos o progesterona, inhibió completamente el desarrollo glandular (Gray y col. 2000; Cooke y col. 2012b).

Debido a los efectos estimulantes de los progestágenos sobre el epitelio uterino (Romagnoli & Concannon 2003), era esperable la presencia de hiperplasia endometrial y piómetra en las hembras tratadas con AMP. Respecto a esto cabe destacar que, aunque no se encontraron diferencias significativas en el área ocupada por glándulas, la misma fue mayor en el grupo AMP, por lo que un aumento de la dosis sería inviable ya que podrían exacerbarse los efectos secundarios.

Se requieren más estudios para dilucidar las razones por las cuales no se pudo generar un fenotipo aglandular en felinos domésticos. Los resultados obtenidos indican que el período prenatal podría ser importante a la hora de implementar un fármaco contraceptivo en esta especie.

Se concluye que la administración de acetato de medroxiprogesterona en la etapa crítica de desarrollo posnatal, no inhibe la adenogénesis ni induce la esterilidad en hembras felinas. Además en felinos este tratamiento parece predisponer a la enfermedad uterina sin prevención de la fertilidad.

Referencias

1. Arnold E. Ovary and uterus. En: Slatter D. (Ed.). Textbook of Small Animal Surgery. 3ra ed. Ed Saunders, RW. Philadelphia, 2002; p. 1496-98.
2. Bartol F, Johnson L, Floyd J, Wiley A, Spencer T, Buxton D. Neonatal exposure to progesterone and estradiol alters uterine morphology and luminal protein content in adult beef heifers. Theriogenology. 1995; 43: 835-44.
3. Beach FA, Buehler MG, Dunbar IF. Sexual cycles in female dogs treated with androgen during development. Behav Neural Biol. 1983; 38: 1-31.
4. Bristol-Gould S, Woodruff T. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). Theriogenology. 2006; 66: 5-13.

5. Brown J, Wakter S, Steinman K. Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non domestic species. Conservation and research center, Smithsonian's National Zoological Park Virginia, USA, 2008; p. 62.
6. Chen Y, Li L, Chen X, Zhang Q, Wang W, Li Y, Yang D. Ovarian volume and follicle number in the diagnosis of polycystic ovary syndrome in Chinese women. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008; 32: 700-3.
7. Cooke P, Borsdorf D, Ekman G, Doty K, Clark S, Dziuk P. Uterine gland development begins postnatally and is accompanied by estrogen and progesterone receptor expression in the dog. *Theriogenology.* 2012a; 78: 1787-95.
8. Cooke P, Ekman G, Kaur J, Davila J, Bagchi I, Clark S. Brief exposure to progesterone during a critical neonatal window prevents uterine gland formation in mice. *Biol Reprod.* 2012b; 86: 63.
9. Cooke P, Ekman G, Kaur J, Davila J, Bagchi I, Clark S. Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Mol Hum Reprod.* 2013; 19: 547-58.
10. Faya M, Carranza A, Miotti R, Ponchón T, Furlan P, Gobello C. Fecal estradiol-17b and testosterone in prepubertal domestic cats. *Theriogenology.* 2013; 80: 584-6.
11. França L, Godinho C. Morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod.* 2003; 68: 1554-61.
12. Gogan F, Beattie I, Hery M, Laplante E, Kordon D. Effect of neonatal administration of steroids or gonadectomy upon oestradiol-induced luteinizing hormone release in rats of both sexes. *J Endocrinol.* 1980; 85: 69-74.
13. Gray C, Taylor K, Bazer F, Spencer T. Mechanisms regulating norgestomet inhibition of endometrial gland morphogenesis in the neonatal ovine uterus. *Mol Reprod Dev.* 2000; 57: 67-78.
14. Gray C, Bartol F, Tarleton B, Wiley A, Johnson G, Bazer F. Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod.* 2001a; 65: 1311-23.

15. Gray C, Taylor K, Ramsey W, Hill J, Bazer F, Bartol F. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biol Reprod.* 2001b; 64: 1608-13.
16. Gray C, Bazer F, Spencer T. Effects of neonatal progestin exposure on female reproductive tract structure and function in the adult ewe. *Biol Reprod.* 2001c; 64: 797-804.
17. Hernandez J, Suarez-Sanchez J, Perez-Martinez M. Morphometric characteristics of female reproductive organs of New Zealand rabbits with different body weight in peripuberal period of transition. *Vet Mex.* 2010; 41: 211-8.
18. Johnston S, Root-Kustritz M, Olson P. Prevention and termination of feline pregnancy. En: *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia, USA, Ed. Saunders, WB, 2001, p. 447-52.
19. Kezele P, Skinner M. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology.* 2003; 144: 3329-37.
20. Lin C, Huang W, Chen K. Measurement of testicular volume in smaller testes: how accurate is the conventional orchidometer?. *J Androl.* 2009; 30: 685-9.
21. Mattoon JS, Nyland TG. Ultrasonography of the genital system. En: *Nyland JS, Mattoon TG. Veterinary Diagnostic Ultrasound*. Ed Saunders, WB. Philadelphia, 1995; p. 141-64.
22. Mills J, Valli V, Lumsden J. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *CanVet J.* 1979; 20: 95-101.
23. Pryor J, Hughes C, Foster W, Hales B, Robaire B. Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. *Environ Health Perspect.* 2000; 108: 491-03.
24. Reggiani P, Barbeito C, Zuccolilli G, Cónsole G, Flamini A, Dardenne M, Goya R. Neonatal thymulin gene therapy prevents ovarian dysgenesis and attenuates reproductive derangements in nude female mice. *Endocrinology.* 2012; 153: 3922-8.
25. Risso A, De la sota P, Garcia P, Diaz J, Corrada Y, Blanco P, Gobello C. Validación biológica de la técnica de extracción a campo de progesterona fecal en el gato doméstico. *Analecta Vet.* 2010a; 30: 5-8.

26. Risso A, Iglesias M, García Romero G, Valiente C, Diaz J, Corrada Y, Gobello C. Validación biológica de la técnica de extracción a campo de estradiol fecal en el gato doméstico: reporte preliminar. *InVet.* 2010b; 12: 53-8.
27. Romagnoli S, Concannon PW. 2003. Clinical use of progestins. En: *Bitches And Queens: A Review*. En: Concannon PW., England G., Verstegen J., Linde-Forsberg C. (Eds.). *Recent advances in small animal reproduction*. International Veterinary Service, University of Cornell. 2003.
28. Spencer T, Bazer F. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *J Anim Sci.* 2004; 82: E4-13.
29. van Wezel I, Dharmarajan A, Lavranos T, Rodgers R. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. *Endocrinology.* 1999; 140: 2602-11.

CAPITULO II

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA EN FELINOS DOMÉSTICOS MACHOS

Introducción

La contracepción masculina ha sido mucho menos desarrollada que la femenina en todos los mamíferos domésticos, incluyendo la especie felina. El hallazgo de un método de esterilización no quirúrgico, eficiente, seguro y aplicable en una única dosis, contribuiría positivamente en el control de la reproducción indeseada en esta especie.

Los esteroides testiculares al momento del nacimiento, están involucrados en la diferenciación sexual y en los mecanismos que controlan la secreción de gonadotrofinas en el animal adulto (Corbier y col., 1992). Una función reproductiva normal depende de la liberación coordinada de las hormonas del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal en momentos críticos del desarrollo sexual, lo que redundará en la proliferación y diferenciación del epitelio seminífero normal (Shupnik y col., 1997).

Se han reportado deficiencias estructurales y/o funcionales de la reproducción después de la administración posnatal de esteroides sexuales a machos que incluyen reducción del peso testicular, tamaño de los túbulos seminíferos, vesículas seminales y próstata, de la esteroidogénesis testicular y de las concentraciones séricas de testosterona (Barañaño y col., 1981; Feigelson y col., 1986; Vanderstichele y col., 1987; Ventanas y col., 1992; Clark y col., 2012). La exposición neonatal a la testosterona (Diamond y col., 1973) o progesterona (Hull, 1981) también redujo el comportamiento sexual de ratas macho.

La administración prepuberal de una dosis suprafisiológica de benzoato de estradiol (Li y col., 2009) o dietilestilbestrol (Li y col., 2008) en ratas disminuyó el número de células de los túbulos seminíferos y generó aplasia de las células de Leydig, alterando la espermatogénesis. El progestágeno, acetato de

ciproterona, indujo la hipoplasia e hipotrofia del epidídimo y vesículas seminales, respectivamente (Jean-Faucher y col., 1984, 1989) y un alto porcentaje de ratones infértiles cuando se inyectó hasta el día 10 del nacimiento (Jean-Faucher y col., 1985). La administración de acetato de medroxiprogesterona en cerdos en el período posnatal, generó una reducción del tamaño testicular y disminuyó los niveles séricos de testosterona a la pubertad (Clark y col., 2012).

Los carnívoros domésticos son muy sensibles al efecto tóxico de los estrógenos lo que limita en gran medida su administración en estas especies (Schwarz y col., 1982). Por otro lado y a nuestro conocimiento, no existen trabajos en felinos con fines contraceptivos utilizando progestágenos en el período posnatal. Estos compuestos, a través de retroalimentación negativa, podrían bloquear al eje gonadal en el período crítico posnatal de desarrollo reproductivo del gato doméstico. Por lo expuesto, los objetivos del presente capítulo se focalizaron en describir los efectos reproductivos clínicos, hormonales e histológicos de la administración posnatal de un progestágeno en felinos domésticos; en segundo lugar también se evaluó la seguridad clínica del tratamiento. El acetato de medroxiprogesterona (AMP), un progestágeno potente, económico y de larga acción (Romagnoli & Concannon, 2003) fue seleccionado como disruptor endocrino para el presente estudio.

Materiales y métodos

Animales

En este trabajo se utilizaron 12 felinos machos neonatos, hermanos de camada, nacidos en nuestra colonia experimental. Los animales fueron expuestos a un fotoperíodo positivo de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad y, a partir de los 40 días de vida, fueron destetados y alimentados con alimento balanceado para cachorros y agua *ad libitum*. Todos los animales se alojaron sueltos en habitaciones de 3 x 4 metros, con enriquecimiento ambiental para su distracción. Además fueron socializados por alumnos entrenados para este fin. Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Uso y Cuidado Animal (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La

Plata, Argentina y todos los experimentos fueron conducidos bajo las guías establecidas por The Guide for The Care and Use of Laboratory Animals, USA.

Diseño experimental y protocolo farmacológico

Los machos se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos, dentro de las primeras 24 hs de vida:

- Acetato de medroxiprogesterona 10 mg/animal (0,2 cc/100g; Singestar MP®, Konig, Argentina), subcutáneo (AMP; n > 6)
- Placebo 0,2 cc/100g de solución salina subcutánea (PLC; n > 6)

***Nota:** La dosis fue seleccionada de acuerdo a Romagnoli & Concannon (2003).

Seguimiento

El seguimiento de los animales se extendió hasta la aparición de los primeros signos clínicos de pubertad. El seguimiento incluyó aspectos físicos, comportamentales y endocrinológicos. Los cachorros se observaron diariamente durante un mínimo de 2 horas a fin de detectar la aparición de comportamiento sexual característico (Johnston y col., 2001) y/o de algún efecto clínico adverso.

Los felinos fueron pesados semanalmente como indicador de crecimiento somático, también se revisaron semanalmente para identificar el momento de separación balano prepucial y la aparición de espículas peneanas (van den Dungen y col., 1989); además se midieron sus testículos en largo, ancho y profundidad para calcular el volumen testicular $V = L \times W^2 \times 0,52$; L= largo; W= ancho (Lin y col., 2009).

Se definió pubertad cuando estos animales tuvieran separación balano prepucial completa y la aparición de espículas peneanas, acompañado por el comportamiento sexual correspondiente (Johnston y col., 2001).

Recolección de materia fecal, extracción húmeda de esteroides sexuales fecales y determinaciones hormonales

En todos los machos se tomaron muestras de materia fecal una vez por semana para la medición de testosterona (T). Las muestras fueron recogidas y conservadas como se describió en el Capítulo I. El procesamiento de la materia fecal se realizó a través del método descrito por Brown y col. (2008) con algunas modificaciones realizadas por Risso y col. (2010a, b) de acuerdo a lo explicado en el Capítulo I.

Prueba de fertilidad in vivo

Cuando los animales alcanzaron la pubertad fueron expuestos para su monta a una hembra de fertilidad probada y en celo. Se les dieron hasta 3 oportunidades (estros de la hembra) de servicio consecutivas. Se observaron los apareamientos o se diagnosticaron por la presencia de los espermatozoides en las citologías vaginales de las hembras. La libido de los animales se clasificó como 0 en aquellos animales con ningún interés por el sexo opuesto, 1 para aquellos que presentaron poco interés y 2 para aquellos que tuvieron repetidas montas y el comportamiento típico de su género (Johnston y col., 2001). Treinta días más tarde se realizó el diagnóstico de gestación en todas las hembras por ultrasonografía (Mattoon y Nyland, 1995).

Examen macroscópico de las gónadas

Inmediatamente luego de la escisión de las gónadas, éstas fueron medidas (largo, ancho y profundidad; cm), pesadas (g), se calculó el volumen (cm^3 ; Chen y col., 2008; Lin y col., 2009) y el índice gonadosomático (%; França y Godinho, 2003).

Estudio microscópico y morfométrico testicular

Se recolectó semen de la cola de los epidídimos utilizando la hoja de un bisturí y se evaluó la motilidad progresiva con un objetivo de 40X sobre una platina térmica. La morfología espermática también fue evaluada luego de su tinción con Giemsa.

A los testículos se les realizó un corte longitudinal. Luego las gónadas fueron colocadas en el fijador de Bouin 12 horas, formol al 10% 48 horas y finalmente alcohol 70 grados hasta ser procesadas con el procedimiento de rutina con parafina. Se obtuvieron cortes seriados de 5 μm que fueron montados, desparafinados en xylol y rehidratados con soluciones graduadas de etanol y finalmente teñidas con hematoxilina-eosina. Las imágenes histológicas se obtuvieron desde un microscopio óptico (Olympus BX50, Tokio, Japón) con los objetivos de 10X, 20X y 40X, a través de una cámara de video conectada (Sony DXC 151, Tokio, Japón) y digitalizadas en formato TIFF color de 24 bits.

Se eligieron al azar 15 a 20 perfiles tubulares redondeados del testículo izquierdo de cada animal. En los túbulos seminíferos se midieron el diámetro tubular (μm), eje mayor y eje menor (μm), área (μm^2) y perímetro (μm) a 10X (Image Pro Plus versión 6.0; Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA). Por este método también se registró la altura del epitelio germinal (μm). El volumen (cm^3) de los componentes testiculares se determinó por estereología mediante microscopía de luz usando una grilla de 441 puntos sobre las fotografías 40X. Para ello se seleccionaron 15 campos al azar (6615 puntos) para cada testículo donde se calculó la proporción de cada una de las estructuras sobre el volumen total de los testículos. Los puntos se clasificaron de la siguiente manera: espermatogonias, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermátides redondas, espermátides elongadas, espermatozoides, células de Sertoli, células de Leydig, compartimento intertubular, membrana basal y lumen. Además se calculó la longitud total de los túbulos seminíferos (metros) y el área nuclear de las células de Leydig, midiendo 25 núcleos de un total de 15 imágenes por testículo por animal (μm^2 ; França y Godinho, 2003). También se calcularon las siguientes proporciones: espermátides redondas/espermatogonias y espermátides/células de Sertoli (Berndtson y col., 1987).

Análisis estadístico

Se compararon las variables de respuesta cuali y cuantitativas entre los grupos AMP y PLC a través de los tests de Fisher y Student, respectivamente. Las concentraciones de T y el volumen testicular se compararon con un ANOVA de medidas repetidas en el tiempo, seguido por la prueba de comparación de Tukey. También se compararon, con esta última prueba, los valores de T en 3 ventanas

consecutivas de tiempo (semanas: 1-3 vs. 4-8 vs. 9-14). Todos los datos se expresaron como la media \pm SEM y se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

Resultados

No se encontraron diferencias entre los grupos AMP y PLC ni en la edad a la pubertad ($21,5 \pm 1,5$ vs. $22,3 \pm 1,2$ semanas; $p > 0,1$), ni en el peso corporal a la pubertad ($2713,8 \pm 181,6$ vs. $2781,5 \pm 278,5$ g; $p > 0,1$; **Figura 1**).

En uno de los machos tratados con AMP no se observó el descenso escrotal de uno de los testículos, el cual se diagnosticó como de localización intraabdominal por ultrasonografía previo a la orquiectomía. Otro de los machos tratados con AMP sufrió un retraso en el descenso de uno de los testículos, el cual se normalizó a la semana 17.

La libido a la pubertad fue normal en todos los animales sin diferencias entre los grupos ($p > 0,1$) y en todos los gatos se diagnosticaron servicios. Cinco machos AMP (5/6) y cinco machos PLC (5/6) demostraron ser fértiles luego de la pubertad y apareamientos ($p > 0,1$).

No se encontraron diferencias en las concentraciones fecales de T entre los tratamientos a través del experimento ($p > 0,1$; **Figura 3**). Cuando se analizó el grupo AMP, los valores de esta hormona resultaron más elevados en la primera ($p < 0,05$) y tercera ($p < 0,05$) ventana de tiempo que en la segunda.

En el estudio macroscópico de los testículos, el peso testicular húmedo, las mediciones y el volumen ($p > 0,1$; **Figura 2**) así como también el índice gonadosomático, no difirieron entre los tratamientos ($p > 0,1$; **Tabla 1**).

Todos los machos tuvieron motilidad y morfología normal de los espermatozoides epididimales, sin diferencias entre los tratamientos ($p > 0,1$).

En la evaluación microscópica de los testículos no se encontraron diferencias significativas ni en las mediciones de los túbulos seminíferos ni en la altura del epitelio germinal ($p > 0,1$; **Tabla 2**; **Figura 4**).

En la composición de la hilera germinal tampoco se observaron diferencias entre los grupos en los espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermátides redondas, espermatozoides y células de Sertoli ($p > 0,1$; **Tabla 2**; **Figura 5**). Por otro lado, tampoco aparecieron diferencias en el espacio intertubular o en las células de Leydig ($p > 0,1$; **Tabla 2**).

Figura 1: Peso (media \pm SEM) de machos felinos tratados posnatalmente (Día 0) con acetato de medroxiprogesterona (AMP) o placebo (PLC) y seguidos hasta la aparición de los primeros signos de pubertad. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

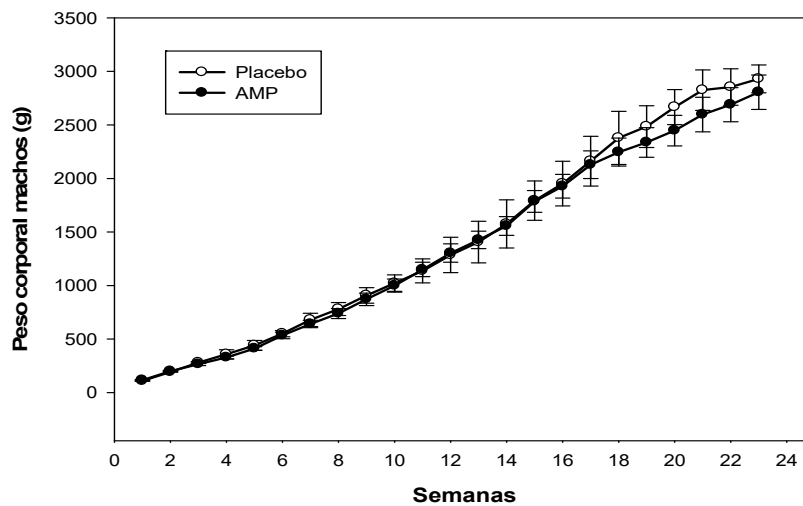


Figura 2: Volumen testicular (media \pm SEM) de machos felinos tratados posnatalmente (Día 0) con acetato de medroxiprogesterona (AMP) o placebo (PLC) y seguidos hasta la aparición de los primeros signos de pubertad. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

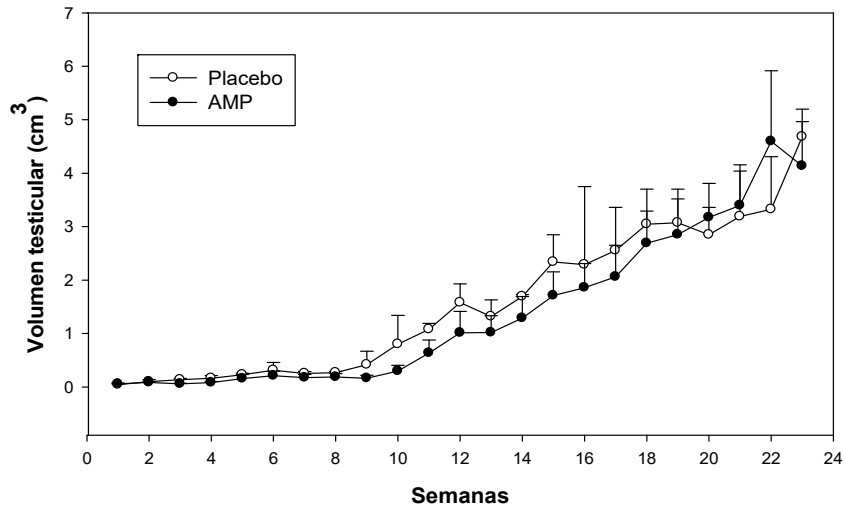


Figura 3: Concentración de testosterona fecal (T; media \pm SEM) de machos felinos tratados posnatalmente (Día 0) con acetato de medroxiprogesterona (AMP) o placebo (PLC), seguidos durante las primeras semanas de vida. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,1$).

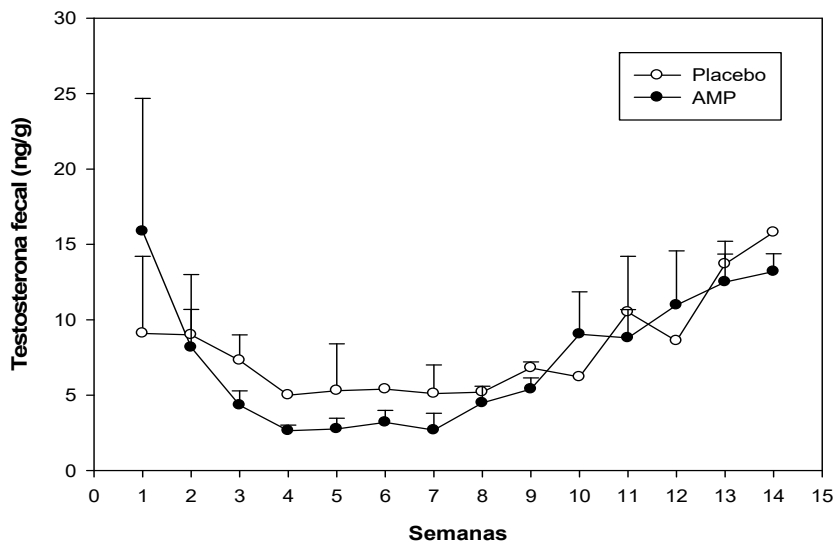


Tabla 1: Parámetros testiculares macroscópicos (media \pm SEM) de machos tratados posnatalmente con acetato de medroxiprogesterona 10 mg/animal (AMP; n=6) o placebo SC (n=6) y orquitectomizados después de la pubertad. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de los parámetros estudiados ($p>0,1$).

Parámetro	AMP	Placebo
Largo testicular (cm)	1,62 \pm 0,1	1,82 \pm 0,06
Ancho testicular (cm)	1,35 \pm 0,08	1,45 \pm 0,06
Peso (g)	1,67 \pm 0,2	1,97 \pm 0,07
Volumen testicular (cm ³)	1,41 \pm 0,22	1,77 \pm 0,21
Índice gonadosomático (%)	0,03 \pm 0,006	0,04 \pm 0,002

Tabla 2: Estructura histológica de los testículos (media \pm SEM) de los machos de la Tabla 1. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de los parámetros estudiados ($p>0,1$).

Parámetro	AMP	Placebo
Eje tubular mayor (μ m)	204,62 \pm 14,14	218,66 \pm 5,51
Eje tubular menor (μ m)	162,01 \pm 8,72	182,94 \pm 4,13
Diámetro tubular (μ m)	183,62 \pm 12,73	200,40 \pm 3,72
Área tubular (μ m ²)	27777,85 \pm 3322,36	31823,73 \pm 1232,71
Perímetro tubular (μ m)	612,58 \pm 37,20	660,46 \pm 13,27
Altura del epitelio germinal (μ m)	46,07 \pm 1,73	49,68 \pm 2,29
Espermatogonias (cm ³)	0,09 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01

Espermatocitos primarios (cm ³)	0,04 ± 0,007	0,42 ± 0,07
Espermatocitos secundarios (cm ³)	0,0015 ± 0,0003	0,0010 ± 0,0001
Espermátides redondas (cm ³)	0,35 ± 0,02	0,37 ± 0,02
Espermátides elongadas (cm ³)	0,07 ± 0,03	0,13 ± 0,01
Espermatozoides (cm ³)	0,004 ± 0,002	0,008 ± 0,002
Células de Sertoli (cm ³)	0,14 ± 0,04	0,13 ± 0,02
Células de Leydig (cm ³)	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Compartimiento intertubular (cm ³)	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Lumen (cm ³)	0,3 ± 0,08	0,4 ± 0,05
Membrana basal (cm ³)	0,04 ± 0,007	0,05 ± 0,01
Proporción tubular-intertubular	8,20 ± 1,67	9,49 ± 1,24
Largo tubular (m)	53,52 ± 10,24	56,72 ± 8,38
Area nuclear de células de Leydig (μm ²)	35,28 ± 2,05	38,20 ± 1,37
Espermátides red./Espermatogonias	6,14 ± 1,98	5,97 ± 1,02
Espermátides/Células de Sertoli	4,68 ± 0,86	3,91 ± 0,90

Figura 4: Cortes histológicos de testículo de los gatos AMP (A) y PLC (B) descritos en la Tabla 2. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina (10X).

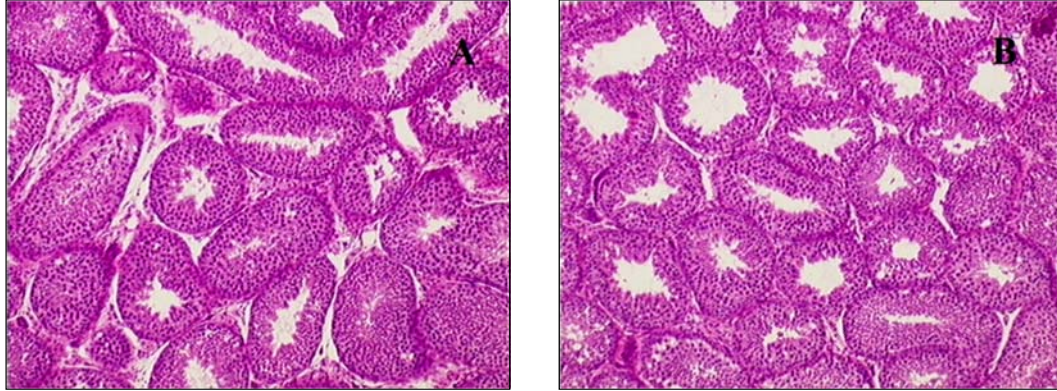
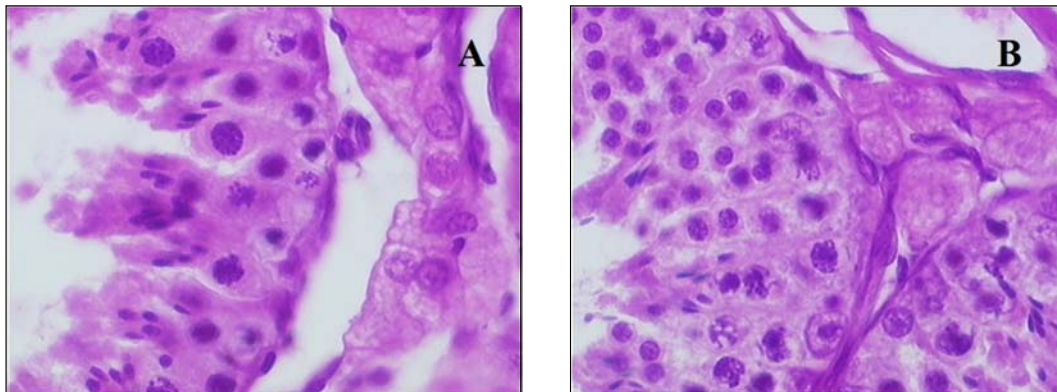


Figura 5: Cortes histológicos de testículo de los gatos AMP (A) y PLC (B) descritos en la Tabla 2. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina (40X).



Discusión

A nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que describe el efecto de una única dosis suprafisiológica de un progestágeno con fines contraceptivos en felinos domésticos.

A diferencia de lo observado en ratones tratados con acetato de ciproterona (Jean-Faucher y col. 1984) en este trabajo se demostró que una única dosis de AMP, administrada en machos felinos postnatos, no alteró la tasa de crecimiento corporal ni la edad a la pubertad. Similares hallazgos a los obtenidos en estos gatos se encontraron en roedores y cerdos androgenizados neonatalmente (Barañao y col., 1981; Ventanas y col., 1992).

Contrariamente a lo descrito en ratas machos, donde la androgenización posnatal provocó una disminución de la libido (Diamond y col., 1973; Hull, 1981) o en ratones tratados con acetato de ciproterona (Jean-Faucher y col., 1985), en el presente estudio todos los animales demostraron un comportamiento sexual normal a la pubertad.

Al igual que en la hembra felina (Capítulo I) la funcionalidad del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal aparentemente no se vio afectada por el progestágeno, ya que no se hallaron diferencias entre los tratamientos en las concentraciones fecales de T durante el período de seguimiento. Los valores elevados de T encontrados durante las primeras semanas de vida son coincidentes con los previamente descritos en felinos posnatales normales (Faya y col. 2013). Por otro lado, el aumento gradual de esta hormona durante las últimas semanas del experimento es esperado al aproximarse la madurez sexual.

En los felinos aquí estudiados no se encontraron lesiones gonadales así como tampoco reducción en la fertilidad. Contrariamente, en los 2 únicos trabajos que describen fertilidad postratamiento con progestágenos posnatales, hubo una disminución de la misma en ratones tratados con acetato de ciproterona (Jean-Faucher y col., 1984, 1985).

A diferencia de lo observado en cerdos (Clark y col., 2012; Ventanas y col., 1992) y ratones (Jean-Faucher y col., 1984, 1985) tratados tempranamente con AMP, testosterona y acetato de ciproterona respectivamente, en donde se observó una disminución en el peso y volumen testiculares, en el presente estudio no se encontraron diferencias para ninguno de los parámetros testiculares

macroscópicos ni microscópicos estudiados. No existen a nuestro conocimiento publicaciones en otras especies en los cuales se haya evaluado el semen epididimal luego de la administración de distintos esteroides neonatales, por lo que resulta imposible realizar comparaciones en este aspecto.

Las discrepancias en los hallazgos obtenidos en el presente estudio, con respecto a lo reportado en otros trabajos similares con esteroides sexuales posnatales (Barañaño y col., 1981; Feigelson y col., 1986; Vanderstichele y col., 1987; Jean-Faucher y col., 1984, 1985; Ventanas y col., 1992; Clark y col., 2012) pueden explicarse por diferencias específicas de especie, al tipo esteroide aplicado, su dosis y momento exacto de aplicación. Así por ejemplo, el acetato de ciproterona usado en los trabajos de Jean-Faucher y col. (1984, 1985) es un progestágeno con importante efecto antiandrogénico (Heisler, 1984) lo que justifica la disminución del crecimiento corporal, el volumen testicular y la fertilidad. En el caso de la aplicación de AMP en cerdos de 3 meses, si bien los efectos antigonadotróficos obtenidos fueron inicialmente evidentes, éstos tendieron a desaparecer luego del periodo de acción del esteroide (Clark y col., 2012),

A partir de estos resultados se concluye que una única dosis de AMP de 10 mg administrada en este número de machos felinos posnatos no alteró la fertilidad ni ninguno de los parámetros macroscópicos o microscópicos testiculares estudiados.

La posibilidad de elevar la dosis del progestágeno posnatal para obtener resultados similares a los trabajos previos queda abierta pero limitada por la posibilidad de profundización y aparición de mayores efectos colaterales en los animales (Romagnoli, 2015). Se requieren más investigaciones para considerar el uso de progestágenos como estrategia farmacológica contraceptiva en felinos machos.

Referencias

1. Baraño JL, Chemes HE, Tesone M, Chiauzzi VA, Scacchi P, Calvo JC, Faigon MR, Moguilevsky JA, Charreau EH, Calandra RS. Effects of androgen treatment of the neonate on rat testis and sex accessory organs. *Biol Reprod.* 1981; 25: 851-8.
2. Berndtson WE, Igboeli G, Pickett BW. Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *J Animal Sci.* 1987; 64: 241-6.
3. Brown J, Wakter S, Steinman K. Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non domestic species. Conservation and research center, Smithsonian's National Zoological Park Virginia, USA. 2008; p. 62.
4. Chen Y, Li L, Chen X, Zhang Q, Wang W, Li Y, Yang D. Ovarian volume and follicle number in the diagnosis of polycystic ovary syndrome in Chinese women. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008; 32: 700-3.
5. Clark SG, Cecere TE, Krisher RL. Effects of a depot progestin on spermatogenesis in postnatal pigs. *Clinical Theriogenology.* 2012; 4: 399.
6. Corbier P, Edwards DA, Roffi J. The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 1992; 100 (2): 127-31.
7. Diamond M, Llacuna A, Wong CL. Sex behavior after neonatal progesterone, testosterone, estrogen, or antiandrogens. *Horm Behav.* 1973; 4: 73-88.
8. Faya M, Carranza A, Miotti R, Ponchón T, Furlan P, Gobello C. Fecal estradiol 17-b and testosterone in prepubertal domestic cats. *Theriogenology.* 2013; 80: 584-6.
9. Feigelson M. Suppression of testicular maturation and fertility following androgen administration to neonatal male rats. *Biol Reprod.* 1986; 35: 1321-32.
10. Franca L, Godinho C. Morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod.* 2003; 68: 1554-61.

11. Heisler C. Effect of the antiandrogen cyproterone acetate on the behavior and mature testis of the male guinea pig (*Cavia aperea procellus*, Linné, 1758). *Z Mikrosk Anat Forsch.* 1984; 98 (3): 443-50.
12. Hull EM. Effects of neonatal exposure to progesterone on sexual behavior of male and female rats. *Physiol Behav.* 1981; 26: 401-405.
13. Jean-Faucher C, Berger M, De Turckheim, Veyssiere G, Jean C. Sexual maturation in male mice treated with cyproterone acetate from birth to puberty. *J Endocrinol.* 1984; 102 (1): 103-7.
14. Jean-Faucher C, Berger M, De Turckheim, Veyssiere G, Jean C. Permanent changes in the functional development of accessory sex organs and in fertility in male mice after neonatal exposure to cyproterone acetate. *J Endocrinol.* 1985; 104 (1): 113-20.
15. Jean-Faucher C, Berger M, Gallon C, De Turckheim, Veyssiere G, Jean C. Long-term alterations on the male mouse genital tract associated with neonatal exposure to cyproterone acetate biochemical data. *J Steroid Biochem.* 1989; 32 (1A): 105-12.
16. Johnston S, Root-Kustritz M, Olson P. The feline estrous cycle. En: *Canine and Feline Theriogenology.* Philadelphia, USA, Ed. Saunders WB. 2001; p. 396-440.
17. Li HC, Chen Q, Wang ZM, Gan WM, Cheng W, Chong T, Shi T, Qiu SD, Ge L, Wang XY. Effects of prepubertal exposure to diethylstilbestrol on testicular development and function of SD rats. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2008; 14 (2): 142-8.
18. Li HC¹, Chen Q, Wang ZM, Qiu SD, Gan WM, Chong T, Ge L, Wang XY. Effects of prepubertal exposure to estradiol benzoate on testicular development and function of Sprague-Dawley rats. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2009; 40 (1): 15-9.
19. Lin C, Huang W, Chen K. Measurement of testicular volume in smaller testes: how accurate is the conventional orchidometer? *J Androl.* 2009; 30: 685-9.
20. Mattoon J, Nyland T. Ultrasonography of the Genital System. En: *Veterinary Diagnostic Ultrasound.* Philadelphia, Ed WB Saunders. 1995; p. 141-64.

21. Risso A, de la Sota P, Garcia P, Diaz J, Corrada Y, Blanco P, Gobello C. Validación biológica de la técnica de extracción a campo de progesterona fecal en el gato doméstico. *Analecta Vet.* 2010a; 30: 5-8.
22. Risso A, Iglesias M, García Romero G, Valiente, Diaz J, Corrada Y, Gobello C. Validación biológica de la técnica de extracción a campo de estradiol fecal en el gato doméstico: reporte preliminar. *InVet.* 2010b; 12: 53-8.
23. Romagnoli S. Progestins to control feline reproduction: Historical abuse of high doses and potentially safe use of low doses. *J Feline Med Surg.* 2015; 17 (9): 743-52.
24. Romagnoli S, Concannon PW. 2003. Clinical use of progestins. En: *Bitches And Queens: A Review.* En: Concannon PW., England G., Verstegen J., Linde-Forsberg C. (Eds.). *Recent Advances in Small Animal Reproduction.* International Veterinary Service, University of Cornell, NY. [www. ivis.org](http://www.ivis.org).
25. Schwarz H, Geyer S, Rüsse M, Hänichen T. Intoxication caused by estrogen administration in the bitch. *Tierarztl Prax.* 1982; 10 (3): 393-402.
26. Shupnik MA, Schreihofner DA. Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. *J Androl.* 1997; 18 (4): 341-4.
27. van den Dungen H, van Dieten J, Tilders F, van Rees G, Schoemaker J. Administration of a GnRH-antagonist to immature rats affects subsequent female and male pubertal development differently. *Acta Endocrinol Copen.* 1989; 120: 778-84.
28. Vanderstichele H, Eechaute W, Lacroix E, Leusen I. Influence of neonatal androgenization on the testicular steroidogenesis in the adult rat. *J Steroid Biochem.* 1987; 28: 421-27.
29. Ventanas J, López-Bote CJ, García C. Further signs of postnatal sexual differentiation in pigs. *Exp Clin Endocrinol.* 1992; 99: 119-22.

CAPITULO III

ADENOGÉNESIS UTERINA EN FELINOS DOMÉSTICOS

Introducción

En mamíferos euterios, el útero se desarrolla como una especialización del conducto de Müller o paramesonéfrico, que da origen al oviducto, útero, cuello y porción anterior de la vagina (Mossman 1987). La pared uterina desarrollada, está compuesta por 2 compartimientos funcionales, el endometrio y el miometrio. El endometrio es el revestimiento interno de la mucosa del útero y deriva de la capa interna del mesenquima ductal. Histológicamente en el endometrio encontramos 2 compartimientos celulares constituidos por el epitelio luminal (EL) y el epitelio glandular (EG) (Gray y col., 2001).

El desarrollo y la diferenciación de la mayoría de los órganos reproductivos se completa durante el período fetal, sin embargo el útero no está completamente desarrollado al momento del nacimiento. Las glándulas endometriales comienzan su desarrollo como invaginaciones del EL que progresivamente invaden el tejido subyacente hasta formar una extensa red de glándulas que se ramifican a través del estroma (E). El desarrollo de estos eventos difiere entre las especies reflejando el estado de madurez uterina al nacimiento, lo que podría ser función de la longitud gestacional de cada una de ellas (Cooke y col. 2013).

Aunque en la mayoría de los mamíferos la adenogénesis uterina es un evento posnatal (Gray y col., 2001), es justo en la pubertad el momento en el cual el endometrio alcanza su madurez histológica y funcional (Gray y col., 2001; Gerstenberg y Allen, 2000). Aunque existe evidencia directa de que los productos de secreción de las glándulas endometriales son necesarios para el establecimiento de la receptividad del útero y la implantación del concepto (Roberts y Bazer, 1988), se encuentra disponible poca información acerca del desarrollo uterino en felinos domésticos. Específicamente, el desarrollo

de la adenogénesis y los patrones de proliferación y diferenciación del EL y EG durante los períodos prenatal, neonatal y posnatal no han sido reportados en los felinos domésticos.

El tratamiento neonatal con progestágenos en rumiantes (Gray y col., 2000; Bartol y col., 1988, 1995) y roedores (Cooke y col., 2012) produjo la inhibición del desarrollo de las glándulas endometriales. Estos antecedentes sugieren que un tratamiento similar podría ser utilizado como método contraceptivo en pequeños animales. Un completo entendimiento de la adenogénesis uterina en felinos domésticos permitiría desarrollar una estrategia, mediante la administración neonatal de esteroides, para inhibir el desarrollo de las glándulas endometriales y así lograr la infertilidad.

El objetivo del presente estudio fue determinar la progresión del desarrollo glandular uterino desde el último tercio de la gestación hasta la pubertad en felinos domésticos. En segundo lugar, se describieron los patrones de proliferación celular para el EL, EG y E uterinos.

Materiales y métodos

Animales

Para el presente estudio se utilizaron 22 úteros: 45 días de gestación (n=2), 60 días de gestación (n=2) y 1 (n=2), 2 (n=2), 3 (n=2), 4 (n=2), 5 (n=2), 8 (n=2), 12 (n=2), 20 (n=2), 24 (n=2) semanas de vida, de hembras felinas nacidas en nuestra colonia experimental, las cuales fueron ovariectomizadas o murieron por causas que no afectaban el desarrollo uterino (aplastamiento, etc.)

Todas las hembras se alojaron sueltas en habitaciones de 3 x 4 metros, con enriquecimiento ambiental para su distracción y fueron alimentadas con alimento balanceado para cachorros y agua *ad libitum*. Luego del destete o de la cirugía se dieron en adopción. Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Uso y Cuidado Animal (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina y todos los experimentos fueron conducidos bajo las guías establecidas por The Guide for The Care and Use of Laboratory Animals, USA.

Examen histológico del útero

Luego de la necropsia o de las cirugías, se cortaron secciones transversas de cada útero (de 0,5-1 cm aproximadamente) tomadas en un punto medio entre la bifurcación y el extremo de cada cuerno, se colocaron en formol al 10% durante 48 hs y luego se pasaron a alcohol 70 grados para su fijación y posterior procesamiento en parafina. Después de su procesamiento, se cortaron secciones de 5 μm y se tiñeron con hematoxilina eosina. Los úteros fueron examinados para detectar la presencia o ausencia de glándulas endometriales y también para la descripción del estado de desarrollo endometrial, de acuerdo con Gray y col. (2001). Las imágenes histológicas se obtuvieron desde un microscopio óptico (Olympus BX50, Tokio, Japón) con los objetivos de 10X, 20X y 40X, a través de una cámara de video conectada (Sony DXC 151, Tokio, Japón) y digitalizadas en formato TIFF color de 24 bits. Las imágenes se analizaron a través del software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).

Determinación por inmunohistoquímica de antígeno PCNA

Los cortes de útero fueron sometidos a pruebas de inmunohistoquímica (IHQ) con el objetivo de evaluar la proliferación celular, utilizando un anticuerpo monoclonal primario de ratón contra el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) como marcador de proliferación (Dako, Clon PC 10).

Inicialmente se procedió a la desparafinización, hidratación y bloqueo de las peroxidasas endógenas y se aplicó a las muestras un método de recuperación antigénica, a través de microondas. Para este método los cortes fueron sumergidos en citrato buffer ph 6 a 750w durante 10 minutos, con el propósito de desenmascarar las ligaduras cruzadas en las cadenas proteicas del tejido fijado debido a la acción del formaldehído como fijador. Luego de enfriar los cortes hasta alcanzar la temperatura ambiente, se procedió al lavado con PBS y a la inactivación de las uniones inespecíficas mediante la incubación con BSA al 1%. Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo primario diluido en 0.1% BSA en fosfato buffer durante 24h a 4°C. PCNA es una proteína ácida nuclear que funciona

como una δ DNA polimerasa colaboradora. En presencia de PCNA y del factor de replicación C, la δ DNA polimerasa comienza la síntesis de DNA y la progresión del ciclo celular.

Las muestras fueron incubadas como se mencionó anteriormente y visualizadas mediante el EnVision System kit (DAKO Cytomation, Carpintería, CA, EE.UU), donde el anticuerpo secundario anticonejo y antiratón, conjugado a una peroxidasa de rábano unida a un polímero de dextrano, fue utilizado como el sistema de detección inmunohistoquímico. En resumen, luego de la incubación con el anticuerpo primario, se realizó una incubación de 30 min con el anticuerpo secundario conjugado. Posteriormente los cortes fueron lavados con PBS y se procedió al revelado de la reacción. La tinción inmunohistoquímica fue completada mediante la incubación con una solución de sustrato cromógeno de 3,3' tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) and H₂O₂. Las células marcadas positivamente demostraron una coloración marrón-dorada. A todos los cortes se les realizó una coloración de contraste con Hematoxilina de Maeyer antes del análisis. Los controles negativos se llevaron a cabo omitiendo el anticuerpo primario.

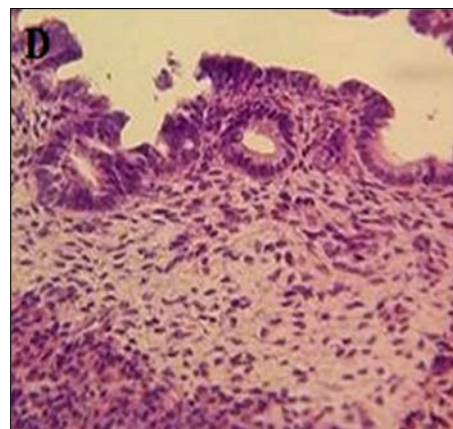
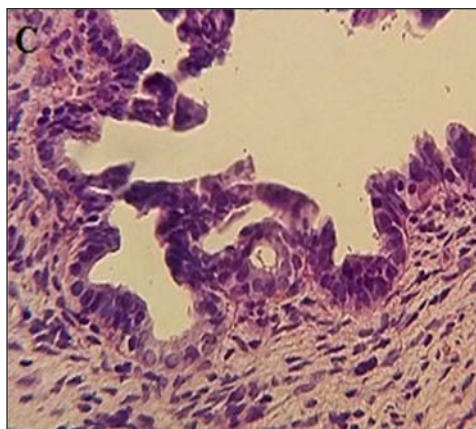
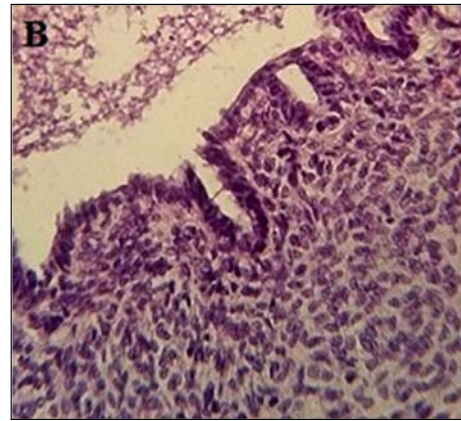
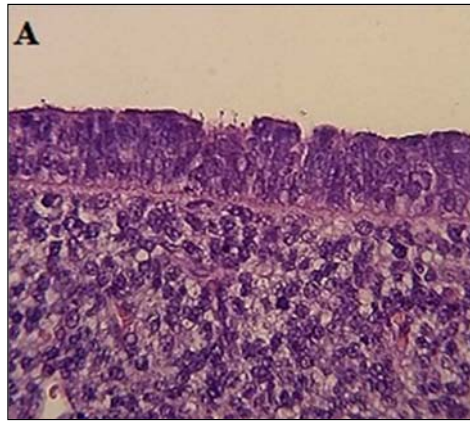
Análisis estadístico

Para las inmunomarcaciones de PCNA se contaron de 6 a 8 campos representativos a 100X de cada preparado. Se calculó el porcentaje de células epiteliales con inmunoexpresión contando los núcleos positivos (pardos) y negativos de 500 células del epitelio luminal, glandular y estroma. Se consideraron tres grupos: prenatal (PRE; desde los 45 a los 60 días de gestación), neonatal (POS1; desde la semana 1 a la semana 8) y las semanas siguientes (POS2; desde la semana 12 a la semana 24). Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA seguido por un test de Tukey. Adicionalmente, se realizó un test de correlación de Spearman entre los porcentajes de células PCNA positivas y la edad de las gatas (el parto fue considerado como edad 0). Los resultados se expresaron como la media \pm SEM y el nivel de significancia fue establecido en $p < 0,05$ (SPSS 17.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

Resultados

En la **Figura 1** se muestra la histogénesis del endometrio felino desde los 45 días de gestación hasta el período previo a la pubertad. Tanto a los 45 días (**Figura 1 A**) como a los 60 días de gestación no se evidencia ningún signo de adenogénesis uterina. El inicio de la adenogénesis se observa en los úteros de 1 semana de vida como una incipiente invaginación del epitelio luminal cilíndrico simple (**Figura 1 B**). Durante la semana 2 se incrementa la invaginación del epitelio hacia el estroma y es posible observar un grado leve de tubulogénesis (**Figura 1 C**). Algo similar se observa durante la semana 3 (**Figura 1 D**), 4 (**Figura 1 E**) y 5 (**Figura 1 F**), en las cuales la tubulogénesis es más marcada a lo largo del borde del epitelio luminal y comienzan a observarse cortes transversales de pequeñas glándulas rudimentarias por debajo del epitelio. Al final de la semana 8 se evidencia un pequeño incremento en el número y profundidad de los cortes transversales de las glándulas (**Figura 1 G**) y, hasta el final del estudio, se puede observar un incremento en la profundidad y ramificaciones de las glándulas presentes en el estroma (**Figura 1 H**). La inmunohistoquímica del antígeno PCNA reveló que la síntesis de ADN fue decreciendo a través del período de estudio en los tres compartimientos celulares ($r = -0,75$; $-0,78$ y $-0,73$ para EL, EG y E, respectivamente; $P < 0,01$; **Figura 2 A, B, C**). Se observó que la proliferación celular del EL (**Figura 2 y 3 A**) comenzó en el período prenatal ($23,1 \pm 2,1$ %) y se mantuvo levemente más alta durante el período POS1 ($25,3 \pm 1,9$ %; $p > 0,05$) para luego descender a valores mínimos llegando a la pubertad ($2,3 \pm 0,9$ %; $p < 0,01$). Como el epitelio glandular (**Figura 2 y 3 B**) no se encontraba desarrollado histológicamente al momento del nacimiento, la inmunohistoquímica se realizó a partir de la tercera semana de vida. Desde esa semana hasta la semana 8 (POS 1) se observó actividad mitótica elevada ($23,4 \pm 3,1$ %) y luego fue descendiendo en el siguiente período (POS2; $4,7 \pm 1,0$ %; $p < 0,01$). La actividad proliferativa del estroma (**Figura 2 y 3 C**) fue muy alta en el período prenatal ($26,1 \pm 3,1$ %; $p < 0,01$) disminuyendo en el período POS 1 ($13,3 \pm 1,5$ %; $p < 0,01$) y nuevamente en el período POS 2 ($3,1 \pm 1,3$ %; $p < 0,01$).

Figura 1: Adenogénesis del útero felino. **A:** prenatal (45 días de gestación), no se observa ningún signo de adenogénesis uterina. **B:** semana 1, se observa el inicio de la adenogénesis como una incipiente invaginación del epitelio luminal. **C:** semana 2, se incrementa la invaginación del epitelio hacia el estroma y es posible observar un grado leve de tubulogénesis. **D:** semana 3; **E:** semana 4; **F:** semana 5, se observan cortes transversales de las glándulas por debajo del EL. **G:** semana 8; **H:** semana 24, se incrementan la profundidad y las ramificaciones de las glándulas presentes en el estroma. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina (40X).



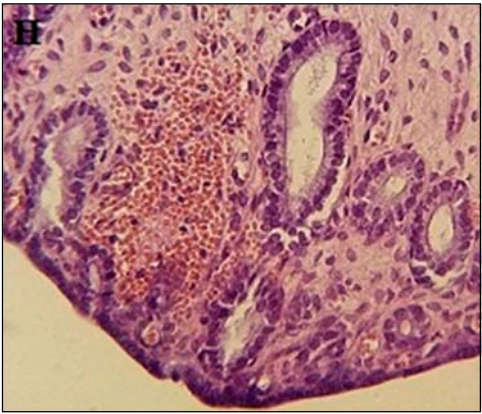
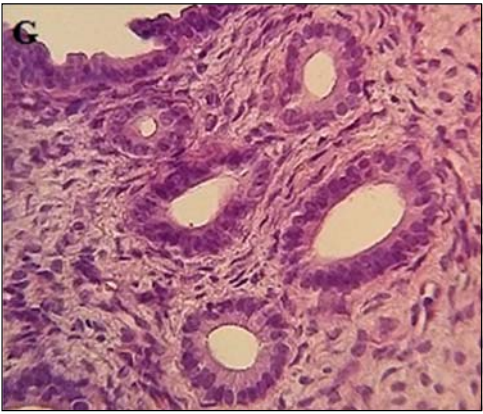
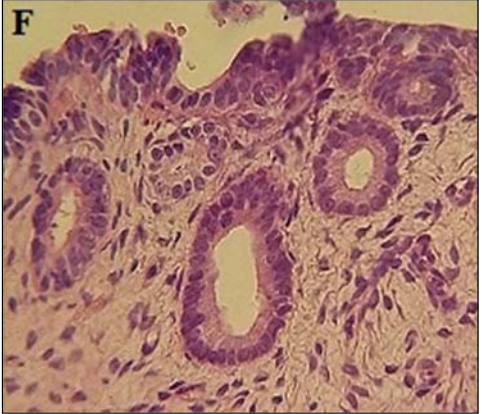
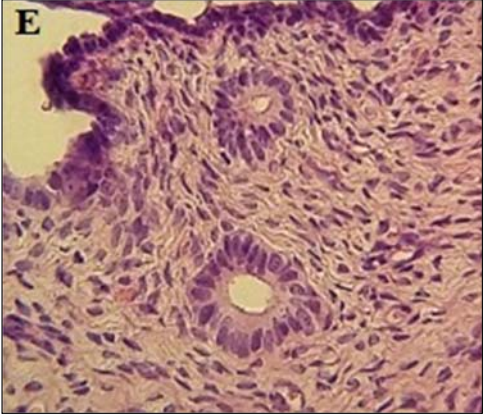


Figura 2: Proliferación celular del útero felino determinada por inmunohistoquímica del antígeno PCNA. **A:** prenatal (PRE), **B:** \leq de 8 semanas de edad (POS 1) y **C:** $>$ de 8 semanas de edad (POS 2).

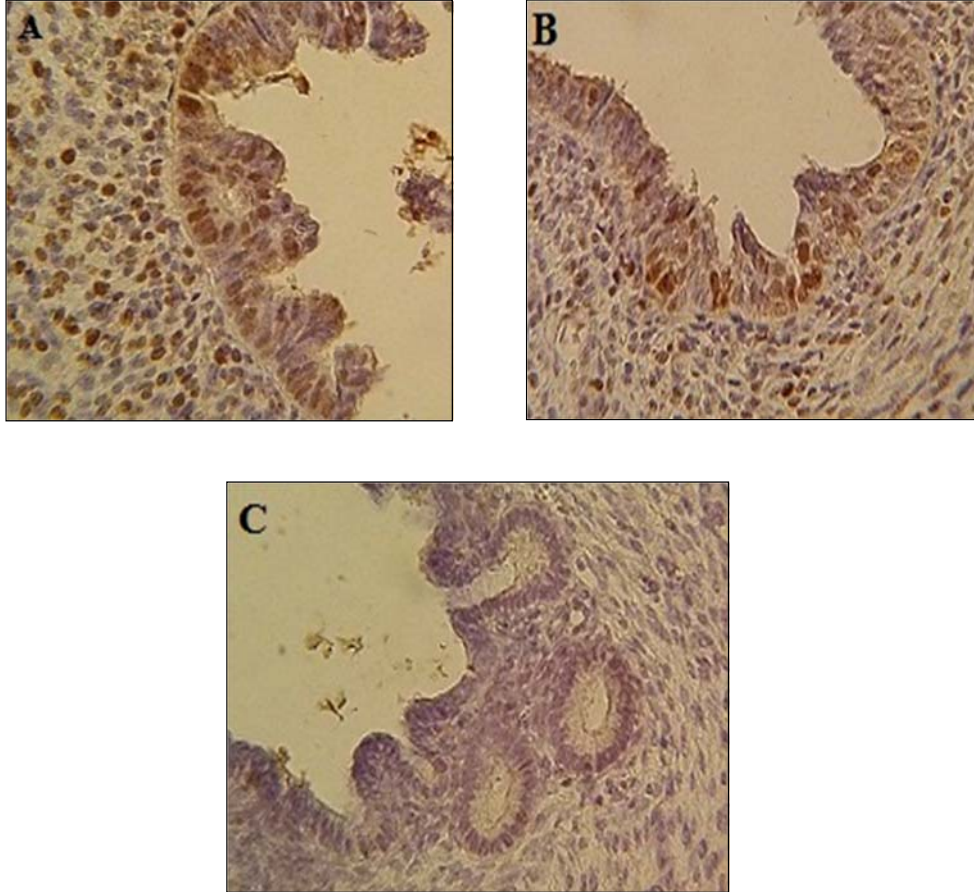
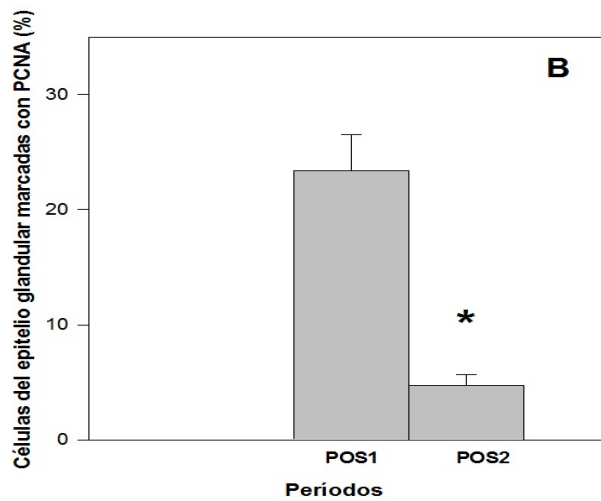
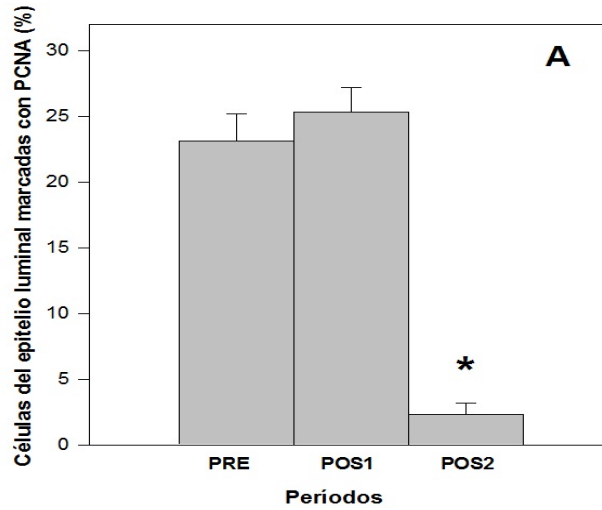
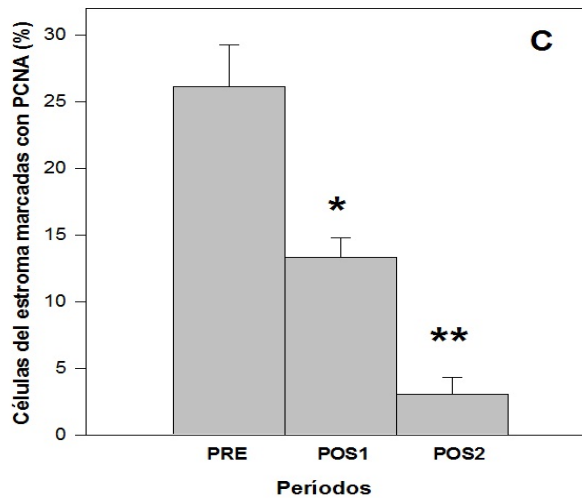


Figura 3: Porcentaje de células uterinas felinas marcadas con PCNA (media \pm SEM) desde la vida prenatal (PRE) hasta la pubertad (POS 1 y POS 2). Epitelio luminal (A; $p < 0,01$). Epitelio glandular (B; $p < 0,01$). Estroma (C; $p < 0,01$). Los asteriscos representan diferencias ($p < 0,01$).





Discusión

En este estudio se describe por primera vez el desarrollo de las glándulas uterinas en felinos domésticos desde el período prenatal hasta la pubertad. El conocimiento del desarrollo y proliferación endometrial en esta especie permitirá el estudio de métodos anticonceptivos permanentes basados en la inhibición de la adenogénesis uterina.

En ovinos y roedores (Gray y col., 2001; Cooke y col., 2012; Filant y col., 2012) se observó que los efectos preventivos de la adenogénesis uterina producidos por los progestágenos, dependen de su administración antes del inicio de este evento fisiológico. Por esta razón, resultó necesario realizar una descripción detallada de la histogénesis y proliferación del endometrio felino que abarque los períodos prenatal, posnatal y prepuberal.

A pesar de que se observó una activa proliferación celular tanto del EL como del E en el período prenatal, el endometrio felino fetal no evidenció ningún signo histológico de formación glandular. La adenogénesis se inició durante la primera semana de vida y se completó básicamente en la semana 4.

A partir de esta semana, tanto el número como el tamaño glandular se incrementaron entre la semana 5 y la 8. En caninos domésticos, se reportó que la adenogénesis comienza al final de la semana 1 y

finaliza entre la semana 6 y la 8 (Cooke y col., 2012). Estas coincidencias halladas en ambas especies eran esperables, ya que los perros también son altriciales y con varios aspectos reproductivos similares.

Para evaluar la proliferación celular del útero en desarrollo, se utilizó un conocido marcador del ciclo celular llamado antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). El antígeno de proliferación celular es una proteína nuclear que favorece la síntesis de ADN, encontrándose elevada en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular y muy baja en células inactivas (Aaltomaa y col., 1993). En el presente trabajo, la inmunohistoquímica del antígeno PCNA reveló la presencia de activa proliferación celular en el período prenatal. Hasta el momento no se ha realizado ningún trabajo en caninos que describa la histogénesis del útero y el patrón de proliferación celular en el período prenatal, razón por la cual no se pudo realizar una comparación entre estas especies.

Después del nacimiento y, en consonancia a lo observado histológicamente, la mayor actividad mitótica ocurrió durante las primeras 8 semanas de vida tanto en el EL como en el EG, para luego decrecer a valores mínimos en los 3 compartimientos estudiados. Este patrón de proliferación celular también coincide con lo descrito para caninos domésticos (Cooke y col., 2012).

Se requieren más estudios para explicar las razones por las cuales fracasó el primer intento de causar agenesia glandular en felinos domésticos mediante la utilización de un progestágeno (López Merlo y col., 2016) y de un andrógeno (Demaldé y col., 2016) en el período posnatal, obteniendo, en el caso del andrógeno, sólo una disminución en el área ocupada por glándulas y en la altura del epitelio uterino post tratamiento. Podría ser que, en esta especie, sea necesaria la administración prenatal de esteroides para inhibir completamente la adenogénesis uterina y obtener así un fenotipo aglandular.

Del presente estudio se concluye que, en felinos domésticos, aunque la proliferación del EL comienza en el período prenatal, la adenogénesis histológica comienza durante la primera semana de vida y ambos fenómenos finalizan de la quinta a la octava semana.

Referencias

1. Aaltomaa S, Lipponen P, Syrjanen K. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolabeling as a prognostic factor in axillary lymph node negative breast cancer. *Anticancer Res.* 1993; 13: 533-38.
2. Bartol FF, Wiley AA, Coleman DA, Wolfe DF, Riddell MG. Ovine uterine morphogenesis: effects of age and progestin administration and withdrawal on neonatal endometrial development and DNA synthesis. *J Anim Sci.* 1988; 66: 3000-9.
3. Bartol FF, Johnson LL, Floyd JG, Wiley AA, Spencer TE, Buxton DF, Coleman DA. Neonatal exposure to progesterone and estradiol alters uterine morphology and luminal protein content in adult beef heifers. *Theriogenology.* 1995; 43: 835-44.
4. Cooke P, Borsdorf D, Ekman G, Doty K, Clark S, Dziuk P, Bartol F. Uterine gland development begins postnatally and is accompanied by estrogen and progesterone receptor expression in the dog. *Theriogenology.* 2012; 78: 1787-95.
5. Cooke P, Ekman G, Kaur J, Davila J, Bagchi I, Clark S, Dziuk P, Hayashi K, Bartol FF. Brief exposure to progesterone during a critical neonatal window prevents uterine gland formation in mice. *Biol Reprod.* 2012; 86: 63.
6. Cooke P, Ekman G, Kaur J, Davila J, Bagchi I, Clark S, Dziuk P, Hayashi K, Bartol F. Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Mol Hum Reprod.* 2013; 19: 547-58.
7. Demaldé L, Lopez Merlo M, Vercellini R, Barbeito C, Fernandez P, Gobello C. Disrupting effect of androgens in postnatal female domestic cats. *Anim Reprod Sci.* 2016; 171: 65-71.
8. Filant J, Zhou H, Spencer T. Progesterone inhibits uterine gland development in the neonatal mouse uterus. *Biol Reprod.* 2012; 86: 146,1-9.
9. Gerstenberg C, Allen W. Development of equine endometrial glands from fetal life to ovarian cyclicity. *J Reprod Fertil.* 2000; 56: 317-26.

10. Gray C, Bartol F, Taylor K, Wiley A, Ramsey W, Ott T, Bazer F, Spencer T. Ovine uterine gland knock-out model: Effects of gland ablation on the estrous cycle. *Biol Reprod.* 2000; 62: 448-56.
11. Gray C, Bartol F, Tarleton B, Wiley A, Johnson G, Bazer F, Spencer T. Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod.* 2001; 65: 1311-23.
12. Gray C, Bazer F, Spencer T. Effects of neonatal progestin exposure on female reproductive tract structure and function in the adult ewe. *Biol Reprod.* 2001; 64: 797-804.
13. Lopez Merlo M, Faya M, Blanco P, Carranza A, Barbeito C, Gobello C. Failure of a single dose of medroxyprogesterone acetate to induce uterine infertility in postnatally treated domestic cats. *Theriogenology.* 2016; 85: 718-23.
14. Mossman H. Vertebrate fetal membranes. New Brunswick, NJ: Rutgers. University Press; 1987.
15. Roberts RM, Bazer FW. The function of uterine secretions. *J Reprod Fertil.* 1988; 82: 875-92.

CONCLUSIONES FINALES

- En las hembras felinas, el tratamiento neonatal con acetato de medroxiprogesterona no alteró la adenogénesis uterina, ya que no se evidenció reducción ni en el área ocupada por glándulas ni en la altura del epitelio uterino. El hecho de que todas las hembras tratadas con el progestágeno que ovularon hayan quedado preñadas confirma la falla en la inducción de infertilidad uterina en estos felinos. Estos resultados alertan a la comunidad científica respecto a las diferencias interespecies y desalientan la realización de futuros estudios con progestágenos con fines contraceptivos en los gatos.
- La administración del mismo protocolo farmacológico en machos felinos posnatos no alteró la fertilidad ni ninguno de los parámetros macroscópicos o microscópicos testiculares estudiados.
- Muy probablemente, debido a los efectos proliferativos de los progestágenos sobre el endometrio, se observó la presencia hiperplasia endometrial y piómetra en las hembras tratadas con AMP. Por esta misma causa, un aumento de la dosis, como estrategia para lograr agenesia glandular, resultaría inviable debido a que los efectos colaterales podrían ser más prevalentes.
- Por otro lado, ninguno de los felinos machos tratados con AMP presentó efectos clínicos colaterales locales ni sistémicos relacionados con esta dosis de progestágeno. La posibilidad de elevar la dosis del progestágeno posnatal en los machos queda abierta aunque limitada por la eventual aparición de efectos colaterales.

- En felinos domésticos, aunque la proliferación celular del epitelio luminal del útero comienza en el período prenatal, la adenogénesis histológica comienza durante la primera semana de vida y ambos fenómenos finalizan de la quinta a la octava semana.
- Estos resultados en hembras podrían sugerir que, en esta especie, sea necesaria la administración prenatal de esteroides para obtener así un fenotipo aglandular que garantice la infertilidad uterina.

PUBLICACIONES



Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com

Failure of a single dose of medroxyprogesterone acetate to induce uterine infertility in postnatally treated domestic cats



M. Lopez Merlo, M. Faya, P.G. Blanco, A. Carransa, C. Barbeito, C. Gobello*

Laboratory of Reproductive Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, National University of La Plata–CONICET, La Plata, Argentina

article info

Article history:
Received 25 June 2015
Received in revised form 4 October 2015
Accepted 7 October 2015

Keywords:
Felid
Endocrine disruption
Genital tract

abstract

In mice and sheep, neonatal administration of progesterone or progestins inhibited development of uterine glands. The aims of the present study were (1) to describe uterine gland development on postnatal Days 6 to 8 and (2) to evaluate the effects of a single postnatal administration of a progestin on reproduction and adult uterine glands morphology and function in domestic cats. Necropsy was performed on three 1-week-old female cats which had died unrelated to this study. Ten female kittens were randomly assigned within the first 24 hours of birth to: medroxyprogesterone acetate 10 mg/animal subcutaneously (MPA; n ¼ 6) or placebo (PLC; n ¼ 4) and followed up until puberty when they were mated. Twenty-four days after the end of estrus, ovulation and pregnancy were diagnosed by serum progesterone measurement and ultrasonography, respectively. Then, all the cats were ovariectomized. After necropsy or surgery, the excised organs were histologically evaluated. Seven queens ovulated (4 of 6 MPA and 3 of 4 PLC; $P > 0.1$) and were pregnant ($P > 0.1$). Four MPA cats presented endometrial hyperplasia and one of them developed a pyometra. The 1-week-old females presented uterine glands in the stage of budding and incipient penetration of the glandular epithelium into the underlying stroma. The MPA-treated queens revealed that the area occupied by uterine glands per square-micrometer (0.55 0.2 vs. 0.49 0.2; $P > 0.1$) and the height of the glandular epithelium (mm; 24.5 6.7 vs. 24.4 7.2; $P > 0.1$) did not differ from those of the PLC group. Neither significant gross nor microscopical differences were also found for ovaries ($P > 0.1$). It is concluded that 1-week-old kittens had an incipient stage of uterine gland development and that a single postnatal supraphysiological dose of MPA did not alter uterine adenogenesis in this species. Furthermore, this treatment seemed to predispose to uterine disease without prevention of fertility.

2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Domestic cat (*Felis catus*) overpopulation is arguably one of the largest global problems facing animal advocates. Although several approaches (i.e., surgical, hormonal, immunological, chemical, etc) have been tried [1], the

optimal option to control undesired reproduction has not been found for this species yet. In this regard, the ideal contraceptive should be efficient, safe, nonsurgical, and suitable for administration as a single dose at a reasonable cost. A simple and permanent method for sterilizing cats would benefit both animals and society.

In mammals such as sheep, pigs, dogs, and rodents, the uterus is not fully developed or differentiated at birth, and uterine gland morphogenesis is primarily a postnatal event [2,3]. For example, canine uterine adenogenesis is initiated by the end of neonatal Week 1 and is completed by Weeks 6

* Corresponding author. Tel.: 54 221-4825372; fax: 54 221-425-7980.

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

to 8 [4]. No information is available concerning domestic cat uterine adenogenesis.

Uterine glands originate as shallow gland buds from the luminal epithelium that invaginate to form tubules through the stroma toward the myometrium when they begin to coil and branch. Although the initial timing of these events may be influenced by gestation length [2,3], final endo-metrial maturation and growth may not occur until after puberty and, perhaps, even after pregnancy [5].

Uterine glands secretory products are required for establishment of uterine receptivity and conceptus preim-plantation, elongation, and survival [6]. Thus, organizational alterations during endometrial gland formation may lead to infertility because of pregnancy loss as blastocysts hatch normally but fail to survive [6].

Exposure of the developing urogenital tract to steroids can affect structure and function of adult tissues compromising reproductive performance [7]. Particularly, progestin administration during the critical postnatal organizational period can alter the developmental trajectory of the uterus with lasting consequences. Exposure of neonatal ewe lambs from birth to 32 weeks of age to the synthetic progestin, norgestomet, ablated endometrial gland morphogenesis [8]. In mice, application of progesterone from postnatal Days 3 to 9 blocked adenogenesis and caused adult infertility [9].

The ability of neonatal progestin treatment in sheep and mice to produce uterine infertility suggests that an approach of this kind may provide a permanent contraceptive strategy with application in companion animal species for addressing overpopulation problems.

To test this hypothesis, the aims of the present study were (1) to describe uterine gland development on post-natal Day 7, (2) to evaluate the effects of a single postnatal administration of a progestin on reproduction and adult uterine glands morphology and function, and (3) to assess the clinical safety of this treatment in domestic cats. For this purpose, medroxyprogesterone acetate, a potent, long-term effect progestin which is inexpensive and worldwide available [10], was chosen as the endocrine disruptor.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Three short-hair female kittens born in the Institutional Colony of the Veterinary School of the National University of La Plata which had died because of traumatic reasons between days 6 and 8 after birth were used to study early postnatal uterine gland development.

2.1.1. Experiment 2

Ten female kittens (6 litters) born in the same colony were included in the trial to evaluate the effects of a single postnatal administration of a progestin on reproduction and adult uterine glands morphology and function. These latter animals were identified, reared free in indoor cat-teries (3 rooms 4 3 meters, with 14 hours of light per day and appropriate enrichment), weaned at the age of 40 days, and fed with dry commercial premium kitten food and water ad libitum. The kittens were socialized by a group of

trained students. This study was reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee of the Veterinary School of the National University of La Plata, and all experiments were conducted under the guidelines established in The Guide for The Care and Use of laboratory Animals, USA.

2.2. Pharmacologic protocols

The females of the same litters were randomly assigned to one of the following treatment groups within the first 24 hours of birth: medroxyprogesterone acetate 10 mg/ animal (Singestar MP, Konig, Argentina) subcutaneously (sc; MPA; n ¼ 6) or placebo: 0.2-mL corn oil sc (PLC; n ¼ 4).

2.3. Follow-up

All the animals were followed up until the first pubertal signs appeared. During the follow-up period, the cats were observed looking for sexual behavior 1.5 hours twice a day and physically examined including weighing once a week. Clinical side effects were also recorded. Vaginal cytology [11] was carried out 3 times/week from the third month of age onward. Puberty was defined by the finding of >80% superficial keratinized cells and a clean background in the vaginal smears accompanied by the typical estrous behavior [12].

2.4. In vivo fertility tests

As the female cats attained puberty, they were exposed to a fertile tomcat during the whole estrous period. Matings were observed and/or diagnosed by the presence of spermatozoa in the vaginal smears. Twenty-four days after the end of estrus, peripheral blood samples were taken for ovulation assessment by electrochemiluminescence immunoassay determination of serum progesterone (P4; Elecsys Progesterone II; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; P4 > 5 ng/mL; [12]). The lower detection limit and the sensitivity of this assay are 0.03 and 0.15 ng/mL, respectively. Within-run precision was less than 5%. Pregnancy diagnosis was carried out by ultrasonography in all cats [13].

2.5. Ovariohysterectomies

After assessment of pregnancy or nonpregnant state, all queens were ovariohysterectomized, and their ovaries and uteri subjected to histology. For the surgery, the animals were premedicated with atropine sulfate, (Atropine Sulfate, John Martin; 0.04 mg/kg, sc), acepromazine maleate (Ace-dan, Holliday; 0.03 mg/kg sc), and butorphanol (Torbutol Plus, Fort Dodge; 0.2 mg/kg, intramuscularly); anesthesia was induced with sodium thiopental (Pentovet TM, Rich-mond; 8 mg/kg, intravenously) in all the females. Once the females were endotracheally intubated, anesthesia was maintained with isoflurane and oxygen in a closed system. A midline laparotomy was performed to excise the ovaries and uteri. After surgery, ketoprofen (Ketofen, Fort Dodge; 1 mg/kg) was injected sc (once) and then orally every

24 hours during 4 additional days. All the queens were placed for adoption.

2.6. Gross and histomorphometric examination

Immediately after necropsy (experiment 1) or surgery (experiment 2), genital tracts were excised. The ovaries and uteri were macroscopically examined and weighed.

The ovaries were sectioned longitudinally, placed in Bouin's fixative for 12 hours, and then changed to alcohol 70 and processed routinely with paraffin embedding. After processing, 5-mm serial sections were cut, mounted on slides, stained, deparaffinized in xylene, rehydrated in graded 70% ethanol solutions, and stained with hematoxylin and eosin.

Follicles were classified as primordial (small ovocyte surrounded by a single layer of squamous or cubic epithelial cells), primary (bigger ovocyte surrounded by a single layer of higher epithelial cells), secondary (two or more layers of granulosa cells and a theca cell layer), antral (fluid-filled antrum, mural, and cumulus granulosa cells and two or more layers of thecal cells), or atretic (degenerated granulosa cells and follicular fluid containing cellular debris) [14]. The number of primordial, primary, secondary, and antral follicles; CL; and atretic follicles per square-millimeter was determined on a computer screen using

20 captured images (20) per animal.

Uteri were sectioned longitudinally for internal inspection. Cross sections (approximately 0.5–1 cm) were taken from a point midway between the external bifurcation and the tip of each uterine horn and processed as described for the ovaries. In the case of pregnant cats (see in the following sections), placentation sites were avoided from the cross-sections.

The uteri were examined for the presence or absence of endometrial glands. The area occupied by uterine glands per square-microns of endometrium over the total area of each microscope field was measured by planimetry. The height of the glandular uterine epithelium was assessed counting 100 cells in a total of 10 images per uterus taken with a 10 objective.

All histologic images were obtained from a microscope (Olympus BX50, Tokyo, Japan; 10) through an attached digital RGB video camera (Evolution VF Color; Q Imaging, USA) and digitalized in a 24-bit true-color tagged image file format. These images were analyzed using the (Image Pro Plus version 6.0; Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).

2.7. Statistical analysis

Quantitative and qualitative differences between MPA and PLC groups were analyzed by the Fisher exact and the Student t tests, respectively. All data were expressed as mean standard deviation, and P values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Experiment 1

All the 6- to 8-day-old kittens presented uterine glands in the stage of budding of luminal epithelium and incipient

penetration of the glandular epithelium into the underlying stroma (Fig. 1).

3.2. Experiment 2

Neither age (43.7 5.9 vs. 35.3 5.8 weeks; $P > 0.05$) nor body weight at puberty (2760.1 331.5 vs. 2720.0 153.9 g; $P > 0.1$) differed between MPA and PLC groups. Five of the six MPA kittens presented a sharp “prepuce like” vulva and mild clitoris enlargement during postnatal weeks 5 to 20 when they gradually normalized.

All the pubertal females showed normal sexual behavior ($P > 0.1$), and when exposed to males during estrus, accepted repeated matings. Ovulation occurred in 7 (4 of 6 MPA and 3 of 4 PLC; $P > 0.1$) of the 10 queens after estrus. The 7 queens that ovulated demonstrated to be pregnant without differences between treatment groups ($P > 0.1$). Nonpregnant females were in interestrus at the time of ovariectomy.

No permanent side effects were observed ($P > 0.1$) except one pregnant MPA queen that presented an open cervix pyometra after pregnancy diagnosis just before ovariectomy was carried out.

No significant gross nor microscopical differences were found between treatments for any studied ovarian parameter (Table 1; $P > 0.1$). Uterine wet weight did not differ between groups (MPA 3.86 g vs. PLC 4.10 g; $P > 0.1$). The gross internal evaluation of the excised uteri revealed a thick and irregular endometrium in 4 of 6 MPA cases (Fig. 2); one of them presenting accumulation of abundant pus (pyometra case mentioned previously). The presence of embryonic vesicles was also found in 4 MPA queens (including the previous one with pyometra in which the vesicles were empty). Conversely, none of the PLC queens, either pregnant or not, presented gross uterine abnormalities.

Microscopic assessment of the uteri of the MPA-treated queens revealed that the area occupied by uterine glands per square-micrometer of endometrium (0.55 0.2 vs.

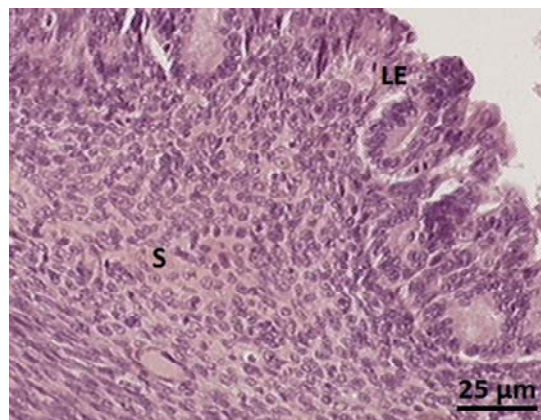


Fig. 1. Uterus (hematoxylin and eosin, 10X) of a 7-day-old female cat. Notice budding and incipient penetration of the glandular epithelium into the stroma. GE, glandular epithelium; S, stroma.

Table 1

Ovarian gross and histologic parameters (mean standard deviation) of female cats treated postnatally with medroxyprogesterone acetate 10 mg/ animal (MPA; n ¼ 6) or placebo sc (n ¼ 6) and ovariectomized after pubertal estrous cycle.

Parameter	MPA	Placebo
Length (cm)	0.95 0.1	0.95 0.1
Height (cm)	0.75 0.2	0.63 0.1
Weight (g)	0.190.0	0.170.0
Volume (cm ³)	0.3 0.2	0.2 0.0
Primordial follicles/mm ²	216.83 31.1	216.5 40.8
Primary follicles/mm ²	6.99 2.8	7.64 2.6
Secondary follicles/mm ²	0.8 0.3	0.53 0.3
Antral follicles/mm ²	0.10 0.2	0.11 0.2
CL/mm	0.31 0.1	0.34 0.3
Atretic follicles/mm	17.33 4.8	14.5 8.7

No significant differences were found between treatments ($P > 0.1$).

0.49 0.2; $P > 0.1$) and the height of the glandular uterine epithelium (mm; 24.5 6.7 vs. 24.4 7.2; $P > 0.1$) did not differ from those of the PLC group (Fig. 3). Cystic endo-metrial hyperplasia was confirmed in 4 of the 6 MPA-treated cats.

4. Discussion

Previous reports [9,15] support the investigation of the potential use of neonatal progestins in small animal permanent contraception. This is the first study that describes feline endometrial development at the end of the first postnatal week and the effect of a single postnatal supraphysiological dose of a potent and time-released progestin, that is, medroxyprogesterone acetate on uterine glands.

In this respect, similarly to dogs [4], another altricial carnivore with similar gestation length and birth to puberty interval (for cat-sized dogs; [16]), cats presented an incipient stage of uterine gland development by the end of the first postnatal week. Furthermore, both uterine glands per square-micrometer and glandular epithelium height clearly increase to maturity with advancing age as shown in



Fig. 2. Gross uterine internal view of a selected female cat treated post-natally with medroxyprogesterone acetate 10 mg/animal. Notice endometrial thickening and irregularity.

untreated animals. The finding of an immature endometrium highlights the importance of testing the effect of postnatal progestins for contraceptive purposes in feline species. Thus, in this study, a single-dose, low-cost, practical protocol was assessed to induce uterine permanent infertility. For this purpose, medroxyprogesterone acetate was administered within the first day of life. As this progestin is known to suppress the gonadal axis for a minimum of 3 weeks [10] and assuming that cats are not an exception among mammals, the whole period of glandular development would be covered with this single treatment.

This early progestin treatment did not seem to affect age at puberty and somatic development, crudely assessed through body weight at puberty. The transient vulvar and clitoris abnormalities observed in most of the MPA-treated cats could be attributed to the androgenic effect of progestins [10].

In contrast to what has been reported for the neonatal administration of other steroids in rodents and dogs [17,18], in this study, progestins did not modify sexual behavior and libido during heat. The hypothalamic-pituitary-ovarian axis functionality was, apparently, not affected as ovulation occurred in almost all the animals, and ovarian morphology was normal. The anovulation, diagnosed in 2 MPA-treated queens, could be due to individual thresholds to vaginal stimulation in these pubertal animals. Furthermore, 1 PLC queen did not ovulate.

Histologic examination revealed that the supra-physiologic dose of the long-term release progestin did not alter uterine adenogenesis in these neonatal domestic felids as neither the area occupied by uterine glands nor the height of the glandular epithelium was reduced by the progestin. Similarly, it has very recently been shown that postnatal medroxyprogesterone acetate does not prevent uterine adenogenesis in domestic dogs [19].

The fact that all the MPA queens which had ovulated became pregnant further confirms the failure to induce a "functional" uterine gland knockout phenotype in felids. Conversely, adult uterine gland knockout ewes were unable to establish pregnancy [5]. Information of fertility after neonatal progestins is not available for canids.

Because of the known stimulating effect of progestins on normal endometrial glands [10], the appearance of endometrial hyperplasia and pyometra was quite expected in these pubertal cats. In this respect, it is worth to note that, although nonsignificant, the area occupied by uterine glands was higher in MPA group. Additionally, it should also be borne in mind that eventual long-term side effects of this treatment could not be discarded out of the time frame of this trial.

Although disproved hypotheses are seldom reported, it is believed that these results will contribute to the clarification of the limited role of postnatal progesterone on the development of a sterilizing strategy in this species. In this respect, the use of a larger progestin dose or serial administrations appears unfeasible as side effects could become more prevalent.

It is concluded that 1-week-old kittens had an incipient stage of uterine gland development and that a single postnatal supraphysiological dose of medroxyprogesterone acetate did not alter uterine adenogenesis in this species.

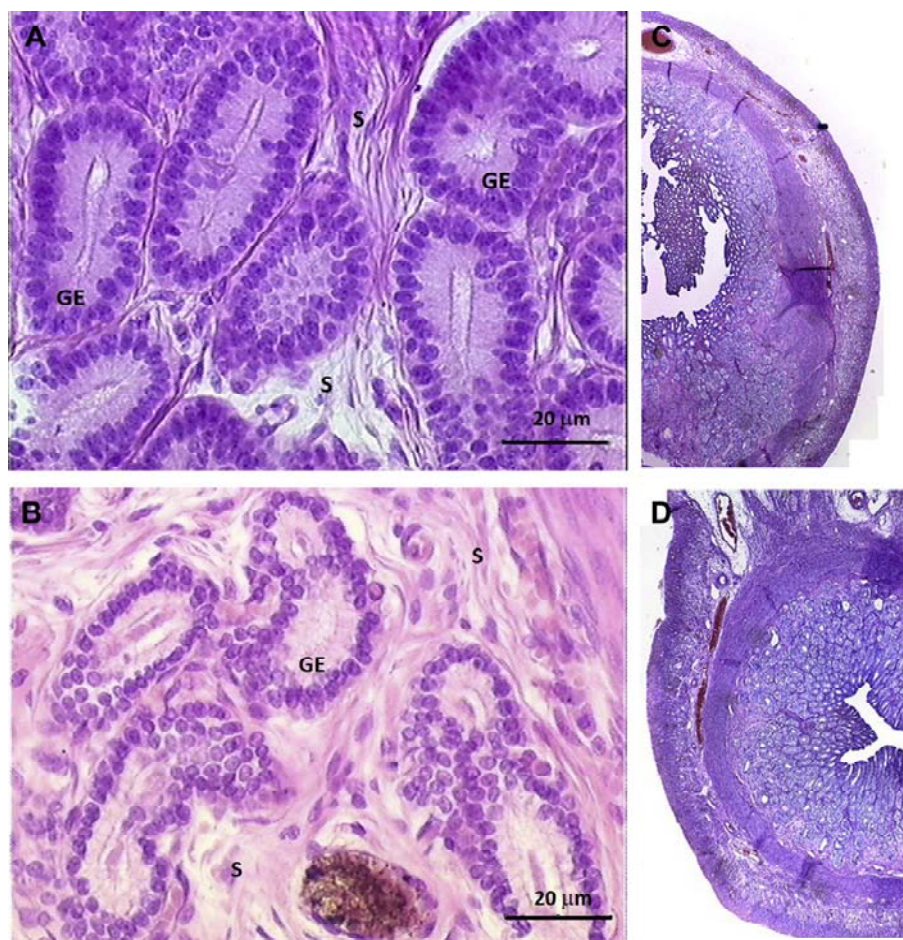


Fig. 3. Uterus (hematoxylin and eosin, 1.25X and 10X) of female cats treated postnatally with medroxyprogesterone acetate 10 mg/animal (A and C) or placebo (B and D) and ovariectomized after pubertal estrous cycle. GE, glandular epithelium; S, stroma.

Furthermore, this treatment seemed to predispose to uterine disease without prevention of fertility.

Acknowledgments

This study was partially funded by the National Agency of Research and Technology, Argentina (PICT 2014 0426), PIIT-AP, National University of La Plata, and National Research Council (PIP 2014–2016 0095) Argentina. MLM is a Research Fellow, and PGB, CB, and CG are Career Scientists of CONICET, Argentina.

References

- [1] Goericke-Pesch S. Reproduction control in cats: new developments in non-surgical methods. *J Feline Med Surg* 2010;12:539–46.
- [2] Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, et al. Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod* 2001;65:1311–23.
- [3] Cooke PS, Ekman GC, Kaur J, Davila J, Bagchi IC, Clark SG, et al. Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Mol Hum Reprod* 2013;19:547–58.
- [4] Cooke PS, Borsdorf DC, Ekman GC, Doty KF, Clark SG, Dziuk PJ, et al. Uterine gland development begins postnatally and is accompanied by estrogen and progesterone receptor expression in the dog. *Theriogenology* 2012;78:1787–95.
- [5] Spencer TE, Bazer FW. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *J Anim Sci* 2004;82:E4–13.
- [6] Gray CA, Taylor KM, Ramsey WS, Hill JR, Bazer FW, Bartol FF, et al. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biol Reprod* 2001;64:1608–13.
- [7] Bartol FF, Johnson LL, Floyd JG, Wiley AA, Spencer TE, Buxton DF, et al. Neonatal exposure to progesterone and estradiol alters uterine morphology and luminal protein content in adult beef heifers. *Theriogenology* 1995;43:835–44.
- [8] Gray CA, Bazer FW, Spencer TE. Effects of neonatal progestin exposure on female reproductive tract structure and function in the adult ewe. *Biol Reprod* 2001;64:797–804.
- [9] Cooke PS, Ekman GC, Kaur J, Davila J, Bagchi IC, Clark SG, et al. Brief exposure to progesterone during a critical neonatal window pre-vents uterine gland formation in mice. *Biol Reprod* 2012;86:63.
- [10] Romagnoli S, Concannon PW. Clinical use of progestins in bitches and queens: a review. In: Concannon PW, England G, Verstegen J, Lindforsberg C, editors. *Recent advances in small animal reproduction*. Cornell University: International Veterinary Service; 2003.
- [11] Mills JN, Valli VE, Lumsden JH. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *Can Vet J* 1979;20:95–101.
- [12] Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PN. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: Saunders WB; 2001. p. 592.
- [13] Yeager AE, Concannon P. Ultrasonography of the reproductive tract of the female dog and cat. In: Bonagura JD, Kirk KW, editors.

- Current veterinary therapy XII. Philadelphia: Saunders WB; 1995. p. 1040–52.
- [14] Van Wezel IL, Harmarajan AM, Lavranos TC, Rodgers RJ. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. *Endocrinology* 1999;140:2602–11.
- [15] Gray CA, Taylor KM, Bazer FW, Spencer TE. Mechanisms regulating norgestomet inhibition of endometrial gland morphogenesis in the neonatal ovine uterus. *Mol Reprod Dev* 2000;57:67–78.
- [16] Gobello C. Prepubertal and pubertal canine reproductive studies: conflicting aspects. *Reprod Domest Anim* 2014;49:e70–3.
- [17] Gogan F, Beattie IA, Hery M, Laplante E, Kordon D. Effect of neonatal administration of steroids or gonadectomy upon oestradiol-induced luteinizing hormone release in rats of both sexes. *J Endocrinol* 1980; 85:69–74.
- [18] Beach FA, Buehler MG, Dunbar IF. Sexual cycles in female dogs treated with androgen during development. *Behav Neural Biol* 1983;38:1–31.
- [19] Ponchon T, Lopez Merlo M, Faya M, Priotto M, Barbeito C, Gobello C. Postnatal exposure to a progestin does not prevent uterine adeno-genesis in domestic dogs. *J Vet Sci* 2015.



Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com

Development and proliferation of feline endometrial glands from fetal life to ovarian cyclicity



Mariana Lopez Merlo^{a, b, 1}, Marcela Faya^{b, c, 1}, Marcelo Priotto^c, Claudio Barbeito^b, Cristina Gobello^{a, b, *}

^a Laboratory of Reproductive Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, National University of La Plata (NULP), Argentina

^b National Research Council (CONICET), Argentina

^c Catholic University of Cordoba, Argentina

article info

Article history:

Received 24 February 2017

Received in revised form

23 May 2017

Accepted 30 May 2017

Available online 1 June 2017

Keywords:

Cat

Uterus

Endometrium

Prenatal

Neonatal

abstract

In this study it was determined the progression of uterine gland development from late gestation to puberty in domestic felids. Cell proliferation patterns for luminal (LE), glandular epithelium (GE) as well as stroma (S) were also described. Twenty-four uteri from female kittens: 45 and 65 days of gestation and 1 to 5, 8, 12, 16, 20 and 24 weeks postnatally were obtained. Uterine cross-sections were submitted for routine histological and immunohistochemical quantification of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) techniques. Although prenatal uteri presented no indication of adenogenesis, 1 week old uteri revealed an incipient budding of the LE. During the second week budding increased and a mild degree of tubu-logenesis of the GE into the stroma was detected. From the third to fifth weeks coiling, branching and cross-sections of glands appeared. These latter findings were more evident in week 8 when GE began to penetrate through much of the S to week 24. PCNA immunostaining revealed that DNA synthesis decreased throughout the study in the 3 cell compartments; ($P < 0.01$). Luminal proliferation began prenatally, it maintained up to postnatal week 8 to markedly decrease to puberty ($P < 0.01$). From postnatal week 3 up to week 8, GE mitotic activity was elevated becoming low thereafter ($P < 0.01$). Stroma actively proliferated prenatally ($P < 0.01$), diminishing up to week 8 ($P < 0.01$) and again during the last weeks ($P < 0.01$) of the study. It was concluded that, in domestic felids, proliferation of LE begins prenatally, histological uterine adenogenesis commenced during the first postnatal week and both events concluded by postnatal weeks 5e8.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In eutherian mammals, the uterus develops as a specialization of the paramesonephric or mullerian ducts, which gives rise to the oviducts, uterus, cervix, and anterior vagina [1]. The mature uterine wall is comprised of two functional compartments, the endometrium and the myometrium. The endometrium is the inner mucosal lining of the uterus and is derived from the inner layer of ductal mesenchyme. Histologically, the endometrium consists of two epithelial cell types, luminal epithelium (LE) and glandular epithelium (GE).

The development and differentiation of most reproductive tract organs is completed during the fetal period; however, the uterus is not fully developed or differentiated at birth. Uterine glands begin to develop as invaginations of LE that progressively invade the mesenchyme, ultimately resulting in an extensive network of epithelial glands throughout the stroma (S). The timing of these developmental events differs among species and reflects differences in uterine maturity at birth [2] which could be a function of gestation length.

Although, in most mammals, uterine gland morphogenesis is primarily a post-natal event there are species differences in the time window at which adenogenesis begins [2]. In general, uterine gland development involves extensive coiling and branching morphogenesis [2], it is not before puberty that endometrium achieves complete histological and functional maturity [3]. In this respect, it was hypothesized that domestic felids are not an exception among mammals. Direct evidence of the essential nature

* Corresponding author. Laboratory of Reproductive Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, National University of La Plata, 60 & 118, La Plata CC 296, B 1900 AVW, Argentina.

E-mail address: cgobello@fcv.unlp.edu.ar (C. Gobello).

¹ Both authors equally participated in this study.

of endometrium and their uterine secretions came with the demonstration that endometrial glands are required for establishment and maintenance of pregnancy [4].

Very scarce information is available regarding postnatal uterine development in felids [5]. Indeed, the time course of endometrial gland development and patterns of differentiation and proliferation of uterine glandular and LE during late gestation, neonatal, infantile and pubertal life in the cat have not been reported.

The ability of neonatal progestin treatment to inhibit uterine gland formation and fertility in ruminants and mice [6e9] suggests that this type of treatment could have promise as a contraceptive methodology in companion animal species. Importantly, it is known that progestin effects are critically dependent on age at initiation of treatment, requiring initiation before the beginning of uterine adenogenesis [6,8,9]. Thus, a complete understanding of the time course of feline adenogenesis will facilitate the development of a rational strategy of neonatal steroid administration to permanently inhibit uterine adenogenesis and produce sterility in abandoned domestic cats. In the present study it was determined the progression of uterine gland development from late gestation to just after puberty in domestic felids. Secondly, cell proliferation patterns for luminal and GE as well as S were also described.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Twenty-four uteri from mixed-breed female kittens: 45 days of gestation (n ¼ 2), just before parturition (approximately 65 days of pregnancy; n ¼ 2) and 1 (n ¼ 2), 2 (n ¼ 2), 3 (n ¼ 2), 4 (n ¼ 2), 5 (n ¼ 2), 8 (n ¼ 2), 12 (n ¼ 2), 16 (n ¼ 2), 20 (n ¼ 2) and 24 (n ¼ 2) weeks postnatally were obtained from the animals born in the Institutional Feline Colony of the Veterinary School of the National University of La Plata (NULP) which had either died due to reasons that would not affect their uterine development or been submitted for elective ovariohysterectomy. Twenty e four weeks old females had just attained puberty. All experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of this University (42.3.14P, 2014).

2.2. Histological examination

Immediately after necropsy or during surgery genital tracts were excised. Uterine cross-sections were taken between the external bifurcation to the tip of each uterine horn and placed in Bouin's fixative for 12 h and then changed to alcohol 70 and processed routinely with paraffin embedding. After processing, 5 mm serial sections were cut, mounted on slides, stained, deparaffinized in xylene, rehydrated in graded 70% ethanol solutions and stained with hematoxylin and eosin. The uterine tissues were examined for the presence or absence of endometrial glands as well for the description of their stage of development according to Gray et al. (2001) [2]. All histological images were obtained from a microscope Olympus BX50, Tokyo, Japan; 10X through an attached digital RGB video camera (Evolution VF Color, Q Imaging, USA) and digitalized in a 24 bit true color TIFF format.

2.3. Immunohistochemical quantification of PCNA

Uteri cellular proliferation was assessed at various ages by immunohistochemical quantification of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Sections (3 mm) were mounted on slides coated with [3-(Methacryloyloxy)propyl]trimethoxysilane (M6514, Sigma, St. Louis, MO, USA), passed through a decreasing graded alcohol

scale and incubated with 0.03% H₂O₂ in methanol (purum P99.0%) for 30 min at room temperature. Sections were then rinsed twice in PBS and exposed to microwave with a power of 750 W 10 min, to antigen retrieval was used a buffer citrate solution (pH 6.0). For PCNA localization, sections were then incubated with mouse monoclonal anti-PCNA antibody (clone PC 10, ascites fluid, Sigma Chemical, St. Louis, MO; 1:3000) at room temperature for 1 h. The En VisionVR 151 detection system IHRP system labeled anti-mouse polymer (Dako Cytomation) was applied for 30 min. Liquid DAB (DakoVR Cytomation) was used as chromogen and hematoxylin for counterstaining. Negative control sections were prepared by omitting primary antibody.

The percentage of cells with PCNA - positive (dun) nuclei, was determined for luminal and GE as well as S by counting 500 cells within 4 quadrant tissue sections from each uterine sample.

2.4. Statistical analyses

The percentage PCNA nuclear labeling (% PCNA - positive cells) for each cell type (luminal glandular or stroma) were grouped as prenatally (PRE; 45 and 65 days of gestation), neonatally (POS1; 1 to 8 postnatal weeks) and remaining weeks (POS2; 20 to 24 postnatal weeks) and compared by analyses of variance followed by Tukey comparison test. To further characterize results of each cell compartment, a Spearman correlation test was carried out between PCNA percentages and cat age (parturition was considered as age 0; SPSS 17.0, SPSS, Chicago, IL, USA). Results were presented as mean ± SEM and the level of significance was set on P < 0.05.

3. Results

Histogenesis of the feline endometrium from gestational life to just after puberty is shown in Fig. 1. Both at gestation day 45 and immediately before birth (approximately 65 days of pregnancy; Fig. 1A) the uteri presented no indication of adenogenesis. One week old uteri revealed nascent endometrial glands represented by an incipient budding of the simple columnar LE (Fig. 1B'). During the second week of age budding of LE increased and a mild degree of tubulogenesis of the GE into the underlying stroma was first detected. A similar scenario appeared throughout the third (Fig. 1B''), fourth and fifth postnatal weeks in which the tubulogenesis was more marked along the LE border and coiling and branching began to be visible appearing the first cross-sections of rudimentary glands beneath the LE. An increase in the number and depth of gland cross-sections was evident at postnatal week 8 (Fig. 1B'''). From that week up to the end of the study, coiling and branching of the GE gradually penetrated through much of the endometrial S (Fig. 1C).

PCNA immunostaining revealed that DNA synthesis decreased throughout the period of the study in the 3 cell compartments (r ¼ 0.75, 0.78 and 0.73 for the LE, GE and S, respectively; P < 0.01; Fig. 2A, B, C). Luminal epithelium (Figs. 2 and 3A) proliferation began prenatally (23.1 ± 2.1%), it maintained slightly, but not significantly, higher during the neonatal POS1 period (25.3 ± 1.9%) to markedly decrease to minimal values up to puberty (2.3 ± 0.9%; P < 0.01). As GE (Figs. 2B and 3B) was not histologically distinct at birth, its immunostaining could be recorded from post-natal week 3 onwards. From that week up to week 8 (POS1), mitotic activity was elevated (23.4 ± 3.1%) becoming low thereafter (POS2; 4.7 ± 1.0%; P < 0.0). Stromal (Figs. 2 and 3C) proliferation was very active prenatally (26.1 ± 3.1%; P < 0.01), diminishing in POS1 (13.3 ± 1.5%; P < 0.01) and again during POS2 periods (3.1 ± 1.3%; P < 0.01) of the study.

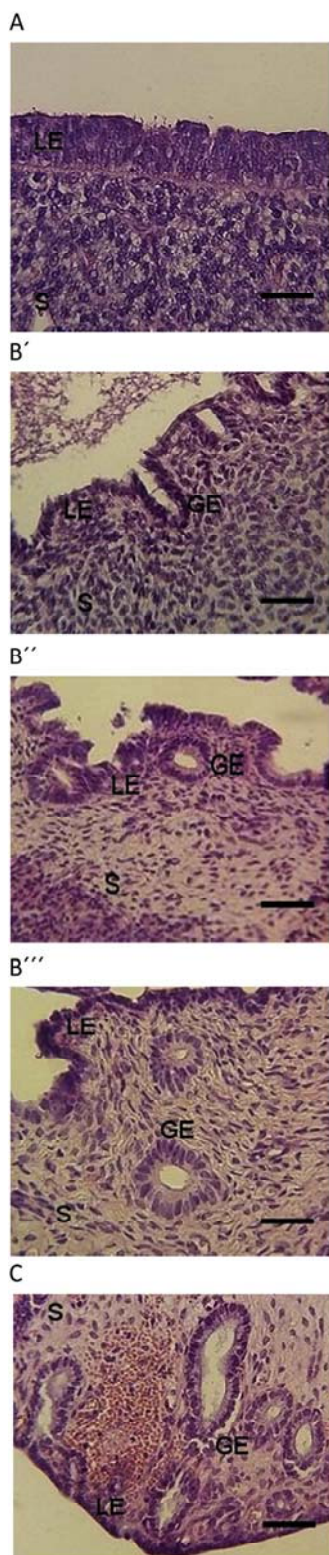


Fig. 1. Adenogenesis in feline uterus (hematoxylin and eosin, 40X). A: prenatal (PRE; before parturition), B: postnatal 1 (POS1; B': 1 week, B'': 3 weeks, and B''': 8 weeks) and C: postnatal 2 (POS2; 24 weeks old). GE: glandular epithelium, LE: luminal epithelium, S: stroma. The scale represents 20 μ m.

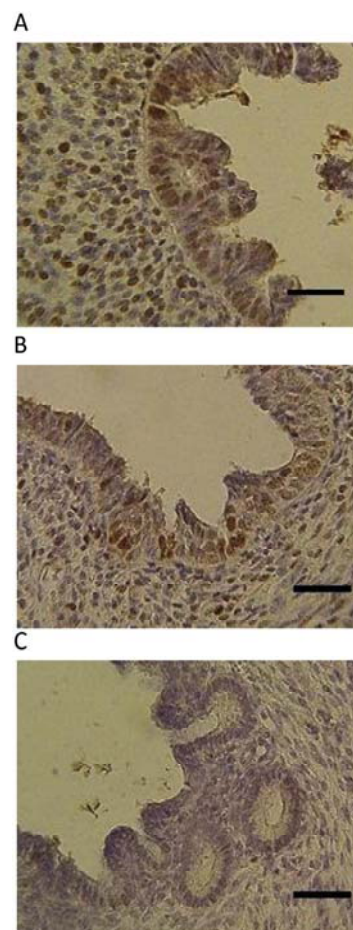


Fig. 2. Cell proliferation of feline uterus visualized by PCNA immunostaining (40X) as dark nuclei. A: prenatal (PRE), B: 8 weeks of age (POS1) and C: > 8 weeks (POS2). The scale represents 20 μ m.

4. Discussion

In this study it is provided for the first time a complete overview of how uterine glands develop and proliferate from prenatal period to just after puberty in domestic felids. Although, a recent study provided a first step toward this goal by describing the incipient stage of uterine adenogenesis in one week old kittens [5] further knowledge was necessary for tuning up a permanent uterine con-tractive methodology in this species. Both murine and ovine models [6,8,9] showed that full inhibition of adenogenesis requires that treatments begin before the initiation of uterine gland development. Thus, a detailed prenatal uterine description was also included.

In spite of an active epithelium and stromal proliferation, feline fetus endometrium appeared very immature with no histological suggestion of early gland formation. These findings are in line with those described for mice, rats, sheep, pigs and cows [10e13] and different to from those of horses and human beings [3,14]. In these felids uterine adenogenesis initiated during the first postnatal week and uterine gland development appeared completed by week

4. From that week onwards, both glandular number and size increased up to postnatal weeks 5e8. In domestic dogs, uterine adenogenesis is initiated by the end of the first neonatal week and

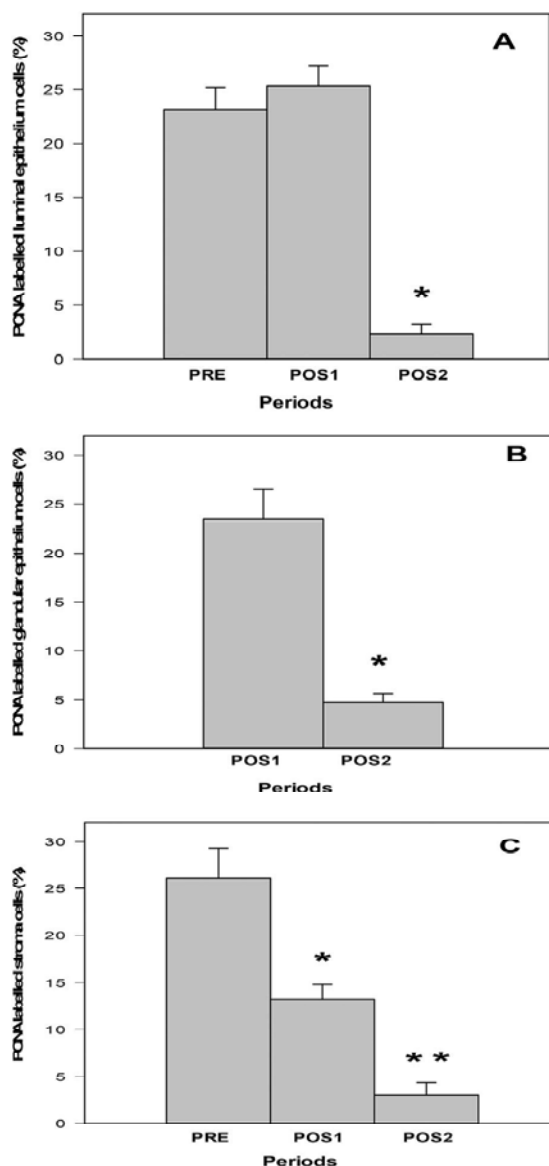


Fig. 3. Percentage PCNA labeled feline uterine cells (mean \pm SEM) from prenatal life (PRE) up to puberty (POS1 and POS2 or > 8 weeks of age, respectively). Luminal epithelium (A; $P < 0.01$). Glandular epithelium (B; $P < 0.01$). Stroma (C; $P < 0.01$). Asterisks represent differences $P < 0.01$.

it is completed by postnatal weeks 6e8 [15]. This coincidence between carnivores' species was quite expected as dogs are also altricial carnivores with similar gestation length and life span to puberty assuming, for this latter parameter, a similar adult body size.

To assess the proliferative activity of the developing uterus, a well known cell cycle marker, namely proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was used. Proliferating cell nuclear antigen main function is in DNA replication being elevated during the S and G2 phases of the cell cycle, but is very low in quiescent cells [16]. Based on data for PCNA labeling, in feline uterus luminal and stromal cell proliferation actively began prenatally. No information is available concerning canine prenatal uterine development and proliferation thus no comparisons can be made in these respects. After birth, and in agreement with the endometrial morphological development,

the highest mitotic activity was reached during the first 8 postnatal weeks by both luminal and GE to significantly decrease to minimal values thereafter in the 3 studied cell compartments. This proliferative pattern is also in line with what has been described for domestic dogs using MKI67 nuclear labeling [15].

Further work is required to unveil the reasons why the first attempt to cause feline uterine gland agenesis failed after both postnatal progesterin [5] and testosterone administration, obtaining only a decrease in the area occupied by uterine glands and the height of the uterine epithelium using the latter treatment [17]. It may be the case that, in this species, prenatal steroid administration is necessary to fully inhibit the estrogen mitogenic effects [18] and, therefore, lead to an aglandular uterine phenotype that meets the sterilizing overpopulation demands.

It was concluded that although, in domestic felids, proliferation of luminal epithelium begins prenatally, histological uterine adenogenesis commenced during the first postnatal week and both physiological events concluded by postnatal weeks 5e8.

Conflict of interest

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

Acknowledgments

This study was partially funded by the National Agency of Research and Technology, Argentina (PICT 2014 0426), Teaching Incentive Program of NULP (V233), and CONICET (PIP 2014e2016 0095) Argentina. MLP is a Research Fellow and MF, CB, and CG are Career Scientists of CONICET, Argentina.

References

- [1] Mossman HA. Vertebrate fetal membranes. New Brunswick, NJ: Rutgers University Press; 1987.
- [2] Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, et al. Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod* 2001;65:1311e23.
- [3] Gerstenberg C, Allen WR. Development of equine endometrial glands from fetal life to ovarian cyclicity. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;56:317e26.
- [4] Roberts RM, Bazer FW. The function of uterine secretions. *J Reprod Fertil* 1988;82:875e92.
- [5] Lopez Merlo M, Faya M, Blanco PG, Carransa A, Barbeito C, Gobello C. Failure of a single dose of medroxyprogesterone acetate to induce uterine infertility in postnatally treated domestic cats. *Theriogenology* 2016;85:718e23.
- [6] Gray CA, Bazer FW, Spencer TE. Effects of neonatal progesterin exposure on female reproductive tract structure and function in the adult ewe. *Biol Reprod* 2001;64:797e804.
- [7] Bartol FF, Johnson LL, Floyd JG, Wiley AA, Spencer TE, Buxton DF, et al. Neonatal exposure to progesterone and estradiol alters uterine morphology and luminal protein content in adult beef heifers. *Theriogenology* 1995;43: 835e44.
- [8] Cooke PS, Ekman GC, Kaur J, Davila J, Bagchi IC, Clark SG, et al. Brief exposure to progesterone during a critical neonatal window prevents uterine gland formation in mice. *Biol Reprod* 2012;86:63.
- [9] Filant J, Zhou H, Spencer TE. Progesterone inhibits uterine gland development in the neonatal mouse uterus. *Biol Reprod* 2012;86(146):1e9.
- [10] Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 beta-estradiol. *Endocrinology* 1985;117:2229e37.
- [11] Bartol FF, Wiley AA, Coleman DA, Wolfe DF, Riddell MG. Ovine uterine morphogenesis: effects of age and progesterin administration and withdrawal on neonatal endometrial development and DNA synthesis. *J Anim Sci* 1988;66:3000e9.
- [12] Bartol FF, Wiley AA, Spencer TE, Vallet JL, Christenson RK. Early uterine development in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;48:99e116.
- [13] Atkinson BA, King GJ, Amoroso EC. Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. *Biol Reprod* 1984;30: 763e4.
- [14] Valdes-Dapena MA. The development of the uterus in late fetal life, infancy, and childhood. In: Norris HJ, Hertig AT, Abell MR, editors. The uterus. Baltimore: Williams and Wilkins; 1973. p. 40e67.
- [15] Cooke PS, Borsdorf DC, Ekman GC, Doty KF, Clark SG, Dziuk PJ, et al. Uterine

- gland development begins postnatally and is accompanied by estrogen and progesterone receptor expression in the dog. *Theriogenology* 2012;78: 1787e95.
- [16] Aaltomaa S, Lipponen P, Syrjanen K. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolabeling as a prognostic factor in axillary lymph node negative breast cancer. *Anticancer Res* 1993;13:533e8.
- [17] Demalde L, Lopez Merlo M, Vercellini R, Barbeito C, Fernandez P, Gobello C. Disrupting effect of androgens in postnatal female domestic cats. *Anim Reprod S. C* 2016;171:65e71.
- [18] Cooke PS, Ekman GC, Kaur J, Davila J, Bagchi IC, Clark SG, et al. Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Mol Hum Reprod* 2013;19:547e58.