

Efectos reproductivos del antagonista de GnRH, Azaline B, en el macho canino

Adagio, L.M.^{1, 3}; Rio, F.J.¹; Hierro, J.A.¹; Lattanzi, L.D.¹; García, M.G.¹; Torres, P.¹; Menguelle, P.¹; Meder, A.¹; Vaquero, P.¹; Wheeler, J.T.¹; Corrada, Y.²; Gobello, C.²

Resumen: El azaline B es un antagonista de las hormonas liberadores de gonadotropinas (GnRH), que se une a los receptores gonadotropos específicos de membrana y compiten con las moléculas endógenas de GnRH por la ocupación de éstos. Este estudio tiene como objetivo describir los cambios espermáticos de semen de eyaculado y de epidídimo, como así también los cambios histopatológicos de testículo en caninos domésticos tratados con el antagonista, azaline B. Se estudiaron 7 perros mestizos, clínicamente sanos, de entre 20 y 25 kg de peso y 2 a 4 años de edad. El estudio incluyó un período de pre-tratamiento y post-tratamiento de 7 y 60 días, respectivamente. En el día 0 del protocolo se le administró al grupo tratado (AZA; n=6), 375 µg/kg de Azaline B por vía subcutánea (SC) y al grupo control (CTL; n=1), un diluyente a igual volumen vía SC. Se realizaron cada 15 días evaluaciones de consistencia testicular, libido, determinaciones de testosterona sérica, eyaculado, examen microscópico de testículos y espermatozoides epididimales. En el grupo AZA las variables cuantitativas se analizaron mediante un test de ANOVA de mediciones repetidas. Las variables estudiadas en semen de eyaculado y de epidídimo se compararon con el coeficiente de correlación de Pearson (r). En los perros medicados la libido no fue afectada por el tratamiento. La consistencia testicular, los niveles séricos de testosterona y el volumen de la segunda fracción del eyaculado variaron a lo largo del experimento con resultados no significativos. En las muestras de semen de eyaculado y de epidídimo la concentración espermática, la viabilidad y las morfoanomalías se modificaron significativamente entre los días 15 y 30 de realizado el tratamiento, existiendo una alta correlación entre ambas muestras. En los preparados histológicos, la

meiosis en el epitelio seminífero descendió un 42%, los días 15 y 30, lo mismo sucedió con los porcentajes de espermatoцитos primarios, espermátides y espermatozoides. En todos los casos las células retomaron la cantidad inicial al final del estudio. Se concluye que el azaline B produjo alteraciones testiculares y seminales reversibles y detectables entre los días 15 y 30 del postratamiento, lo cual permite vislumbrar a los antagonistas del GnRH como drogas futuras para ser utilizadas en contracepción y enfermedades hormonodependiente del perro.

Palabras claves: Azaline B, antagonistas del GnRH, canino, reproducción

Reproductive Effects of GnRH, Azaline B, in the male dog

Abstract: Azaline B is the antagonist gonadotropin releasing hormone (GnRH), that binds to specific membrane receptors Gonadotrophand compete with endogenous GnRH molecules by the occupation of these. This study aims to describe changes of semen ejaculated and epididymis sperm, as well as testicular histopathological changes in domestic dogs treated with the antagonist, Azaline B. 7cross-bred dogs, clinically healthy, between 20 and 25kg and 2 and 4years old were studied. The study included a period of pre- and post-treatment of 7 and 60 days, respectively. On day 0 of the protocol (AZA, n = 6), 375 mg / kg of Azaline B subcutaneously (SC) was administered to the treated group and to the control group (CTL, n = 1), an equal volume diluent SC. Testicular consistency studies, libido, testosterone determinations of serum, ejaculate, microscopic examination of testes and epididym

1 Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam;

2 Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

3 E-mail L.M. Adagio: lmadagio@hotmail.com

malspermatozoa were made every 15 days. In the AZA group quantitative variables were analyzed by ANOVA repeated measures. The variables studied in ejaculated and epididymis semen were compared with the Pearson correlation coefficient (r). Libido was not affected in medicated dogs. Testicular consistency, serum testosterone levels and the volume of the second fraction of ejaculated varied throughout the experiment with no significant results. In samples of ejaculated semen and epididymal sperm concentration, viability and morphoanomalies changed significantly between the 15 and 30 days of the treatment being completed, there is a high correlation between the two samples. In histological

samples, meiosis in the seminiferous epithelium decreased by 42% on days 15 and 30, so did the percentage of primary spermatocytes, spermatids and spermatozoa. In all cases the cells regained the initial amount at the end of the study. We conclude that testicular and seminal alterations produced by the Azaline B are reversible and detectable between 15 and 30 days post-treatment, which suggests the GnRH antagonists as future drugs to be used in contraception and hormone dependent diseases of the dog.

Keywords: Azaline B, GnRH antagonist, canine, reproduction.

Introducción

Se considera que la orquiectomía es el método quirúrgico tradicional para el control de la población canina, pero tiene el inconveniente de ser irreversible. Esta situación dificulta la utilización de la cirugía en perros de razas o con propietarios que deseen efectos anti reproductivos sólo por un período determinado de tiempo. Por lo tanto, se están desarrollando estudios con nuevas drogas que cumplan la función de producir infertilidad temporaria, que sean seguros y confiables (Kuzler & Wood, 2006). En los últimos 30 años se han utilizado y observado el efecto reproductivo de más de 2000 análogos de las hormonas liberadoras de gonadotropina (GnRH) en distintas especies animales (Padula, 2005).

La GnRH es un decapeptido sintetizado y liberado en forma pulsátil por las neuronas ubicadas en el núcleo arcuato y en el área preóptica del hipotálamo. Para ejercer su efecto, se une a los receptores de GnRH localizados en las células de la hipófisis anterior. De esta manera, la hipófisis se estimula para la producción y liberación de las gonadotropinas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), quienes van a actuar sobre los órganos reproductivos para la liberación de esteroides y producción de espermatozoides (Hult, 1987; Jiang y col., 2001; Chillik, 2002; Valiente y col., 2008).

Al poco tiempo de conocerse la estructura química de la GnRH, por sustituciones de algunos aminoácidos de la molécula original se han obtenidos los denominados análogos del GnRH: agonistas y antagonistas. Las primeras generaciones de estos compuestos tenían el inconveniente de presentar solubilidad limitada, efectos de corta duración y ser degradados por las peptidasas del tracto gastrointestinal dificultando la administración oral (Hoffman y Schuler, 2000; Herbst, 2003). Por lo tanto, los nuevos

estudios consisten en desarrollar análogos sintéticos que mejoren la calidad de esos efectos adversos facilitando su utilización.

Los agonistas tienen una gran afinidad por el receptor de GnRH de la hipófisis y una vida media prolongada que los hace más potentes que las moléculas endógenas de GnRH. Induce la liberación de grandes cantidades de gonadotropinas y un incremento del número de receptores de GnRH. Pueden llegar a producir efectos antagonistas o anti reproductivos cuando se realiza una administración continua y prolongada, originando internalización del complejo receptor-agonista de la GnRH, que se acompaña de una disminución del número de receptores de GnRH y la hipófisis se vuelve refractaria al estímulo de la GnRH (Vickery, 1985; Chillik, 2002; Tarlatzis and Kolibianakis, 2007). Previo a esto, se produce una gran liberación de hormonas gonadotróficas desde la hipófisis anterior y de hormonas sexuales desde los órganos reproductivos, tanto en machos como en hembras. Este efecto se denomina “flare up” y tiene una duración aproximada de 7 a 14 días de iniciado el tratamiento, dependiendo del agonista utilizado (Wrigh, 2001). Si lo que se pretende es originar un efecto contraceptivo, esta liberación masiva produce algunos efectos indeseables sobre todo en la hembra canina (Ej: inducción del celo, aparición prematura del pico ovulatorio).

A diferencia de los agonistas, los antagonistas de GnRH tienen un efecto inhibitorio directo sobre la secreción de gonadotropinas. Se unen a los receptores gonadotropos específicos de membrana bloqueando en forma competitiva la unión y estimulación de los mismos con las moléculas endógenas de GnRH (Vickery, 1985). En contraposición de lo que ocurre con los agonistas de GnRH, no hay secreción inicial de gonadotropinas, y por ende, no se produce el efecto indeseable de estimulación del eje antes de la supresión. Así, la inhibición gonadal se obtiene más rápidamente con antagonistas que con agonistas lo que se considera una ventaja muy importante (Vickery y Nestor, 1987; Gobello, 2006).

Las primeras generaciones de los antagonistas requerían altas dosis para mantener una adecuada supresión de los receptores de GnRH (Vickery y Nestor, 1987), por su limitada solubilidad. Debido a su corta vida media se necesitaba administrar dosis prolongadas en el tiempo. Además, producían cuadros alérgicos localizados y sistémicos originados por la liberación de histamina (Vickery y Nestor, 1987; Gobello, 2006; Valiente, 2008). Todos estos problemas fueron superados en, su mayor parte, con la aparición de la tercera generación de antagonistas, como el teverelix, abarelix, cetorelix, ganirelix y acyline entre otros; que demostraron ser bien tolerados en

varias especies incluso en el perro (Herbst, 2003 y 2004; Gobello, 2006). El efecto de los antagonistas en caninos fue descrito por primera vez hace más de dos décadas, cuando se encontraban disponibles únicamente los primeros compuestos. Así se demostró en perros machos que el antagonista de segunda generación detirelix (4 a 2 mg/kg), causa declinación de la testosterona sérica en forma dosis y tiempo dependiente. Con dosis de 100 µg/kg/día de detirelix se abolió totalmente la espermatogénesis (Vickery y col., 1989).

Tras un intervalo de más de 20 años en el estudio de los antagonistas de GnRH en la especie canina, y debido a la aparición de nuevos compuestos potentes y seguros, se describió el efecto clínico y endocrino de un antagonista de tercera generación, acyline en machos y hembras (Valiente y col., 2007, 2009a y 2009b; García Romero y col., 2009; Gobello, 2007). Una única aplicación de 330 µg/kg de acyline suprimió la concentración de gonadotrofinas durante 10 días sin efectos colaterales locales ni sistémicos en perros (García Romero y col., 2009). En gatos, la utilización de acyline en una concentración similar a la utilizada en perros, ocasionó modificaciones significativas de motilidad, vigor y morfoanomalías en espermatozoides epididimales, alteró la altura del epitelio germinal y redujo el número de espermatozoides, espermátides, tanto en el epitelio germinal como en la luz de los túbulos seminíferos (García Romero y col., 2012).

El azaline B [Ac-D2Nal1,D4Cpa2,D3Pal3, 4Aph5(atz),D4Aph6(atz),Ilys8,DAla10]-GnRH es otro potente antagonista de GnRH de tercera generación que demostró suprimir, sin reacciones adversas, varias funciones reproductivas en otras especies (Campen y col., 1995). Nada se ha descrito sobre los efectos de este antagonista en el perro. El conocimiento detallado de aspectos clínicos, endocrinos e histológicos gonadales de estos compuestos, permitirá su eventual aplicación práctica futura. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es describir aspectos clínicos, endocrinos, seminales e histológicos gonadales del antagonista de tercera generación azaline B en el canino macho.

\ Materiales y métodos \

Animales

Se estudiaron 7 perros mestizos, clínicamente sanos, de entre 20 y 25 kg y 2 a 4 años, provenientes de la Canilera Municipal de la Sociedad Protectora de Animales de la ciudad de General Pico, La Pampa. Los perros

fueron ubicados en caniles experimentales 2 meses antes de iniciado los estudios para su adaptación, desparasitación y vacunación. Los animales se alimentaron con balanceado superpremium (Royal Canin®, Argentina) y se les proporcionó agua *ad libitum*.

Periodo pre-tratamiento, tratamiento y post-tratamiento

El estudio incluyó un periodo de pre-tratamiento y post-tratamiento de 7 y 60 días, respectivamente. El día 0 del protocolo los animales se distribuyeron aleatoriamente a un grupo tratado con azaline B (The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA) a los que se les administró 375 µg/kg por vía subcutánea (AZA; n=6) y un animal control al cual se le administró subcutáneamente el volumen correspondiente del diluyente (CTL; n=1). En ninguno de los casos se superó un ml por sitio de aplicación. El azaline B fue provisto en un polvo al que se diluyó en DMSO al 5% en aceite vegetal.

Examen testicular y libido

Durante todo el experimento se evaluaron quincenalmente la consistencia (blanda, tenso-elástica y firme) testicular y la libido. La libido se evaluó subjetivamente con una escala de 0 a 3 (0: sin erección, ni eyaculación; 1-2: graduaciones intermedias; 3: movimientos de empuje vigorosos, erección y eyaculación rápida) durante la estimulación manual para la recolección de semen.

Espermogramas

Las recolecciones de semen se realizaron quincenalmente mediante el procedimiento manual (Johnston, 1991). Se colectó la segunda fracción del eyaculado en un tubo graduado y atemperado y se registró el volumen y pH del mismo. Se evaluó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el vigor a 400x. Se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos mediante la coloración supravital de eosina – nigrosina (Minitub, Alemania) y la concentración de espermatozoides se realizó con cámara de Neubauer mejorada. La cantidad total de esperma se calculó multiplicando la concentración obtenida por el volumen de la segunda fracción. La morfología se examinó en una muestra coloreada con rosa de bengala al 3% en agua destilada examinada bajo inmersión (1000x) en 200 esper-

matozoides. Se contó el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y con anomalías primarias y secundarias (Johnston, 1991).

Determinación de testosterona sérica

A la totalidad de los animales, en forma quincenal se les extrajo sangre por venopunción periférica para la determinación de testosterona sérica. Las muestras obtenidas se centrifugaron por 15 minutos y se guardaron a -20°C hasta su procesamiento. La testosterona se determinó mediante un radioinmunoensayo comercial de fase sólida (Coat-A-Count, DPC®, Los Angeles, USA). La sensibilidad del kit es de 0.04 ng/dl.

Orquiectomías unilaterales

Los animales fueron anestesiados con una combinación de maleato de acepromazina (5 a 1,1 mg/kg, Acedan®, Holliday, Buenos Aires), diazepam (0,5 mg/kg., Valium®, Roche, Buenos Aires) y ketamina (20 mg/kg, Ketamina 50®, Holliday, Buenos Aires) vía endovenosa y se procedió a la realización de orquiectomías unilaterales (Boothe, 1993). El cronograma quirúrgico consistió en distribuir las cirugías al azar, donde se evaluaron dos testículos de perros tratados (AZA; n=2), cada quince días, desde el día -7 del pre tratamiento al día 60 del pos tratamiento. En cada animal fue realizada la orquiectomía derecha, en primer orden, y en segundo término la izquierda. En el perro control, las cirugías se realizaron en el día -7 y en el día 60 del postratamiento.

Examen microscópico de los testículos y observación de los espermatozoides epididimales

De los testículos extraídos se recuperaron los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo seccionándola en forma longitudinal con hoja de bisturí y recogiendo el material exudado en un portaobjeto atemperado en platina térmica. Se evaluó la motilidad y vigor de los espermatozoides recuperados a x200. Parte del material obtenido fue teñido con la coloración supravital de eosina-nigrosina y la coloración de rosa de bengala, para observar el porcentaje de espermatozoides vivos (x400) y de morfoanomalías espermáticas (x1000), respectivamente (England y Allen, 1989). Para ambos propósitos se evaluaron un mínimo de 200 espermatozoides por preparado.

Estudio histopatológico

Los testículos extraídos fueron pesados y luego cortados en una sección longitudinal y posteriormente se tomaron muestras de tejido de 0,5 cm x 0,5 cm de tamaño. Se fijaron en solución de Bouin por 24 horas. Luego fueron transferidos a alcohol etílico 70°, y se deshidrataron en una batería de alcoholes en concentraciones crecientes, pasando posteriormente a xylol. Se incluyeron en parafina, efectuándose cortes de 5 μ de espesor y se colorearon con hematoxilina-eosina para su posterior examen con el microscopio óptico (Olson, 1991).

Se observaron un mínimo de 20 campos microscópicos a x125. La caracterización del ciclo seminal fue basada en el examen de los túbulos seminíferos, mediante el registro de los tipos y estratificación de las células espermatogénicas que forman parte de la estructura tubular (espermatogonias, espermocitos I y II, espermátides redondas y elongadas, espermatozoides en la luz del túbulo y células de Sertoli). De un mínimo de 20 cortes transversales de túbulos seminíferos por preparado, se midió el diámetro tubular y la altura del epitelio seminal, y también se registró la presencia de divisiones meióticas. En el tejido intersticial se evaluó la existencia de células de Leydig. En todos los casos la cantidad células o meiosis pre-tratamiento (día -7) se consideró como el 100%.

Análisis estadístico

En el grupo AZA las variables cuantitativas se analizaron mediante un test de ANOVA de mediciones repetidas en el tiempo considerando como variable intrasujeto el día (-7, 15, 30, 45 y 60). En aquellas variables estudiadas en semen eyaculado y epididimario (porcentajes de motilidad, viabilidad y morfoanomalías) se calculó el coeficiente de correlación entre los resultados obtenidos en ambas muestras. Los resultados del animal control (CTL) permitieron solamente ser representados en las figuras y comparados con el día -7 de los perros del grupo AZA mediante un test de Student (Sigma Stat; SPSS; Inc. Chicago, IL, USA). En todos los casos el nivel de significancia se fijó en $P < 0.05$.

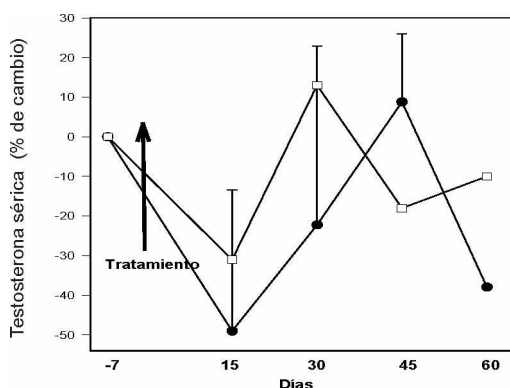
**\ Resultados **

Previo al tratamiento (día 0) todos los animales presentaron, libido, testículos, características seminales y valores de testosterona normales para

la especie. En el perro control, cada una de las variables estudiadas durante el pre y postratamiento no difirieron de las del día -7 de la totalidad de los perros tratados con azaline B ($P > 0.05$).

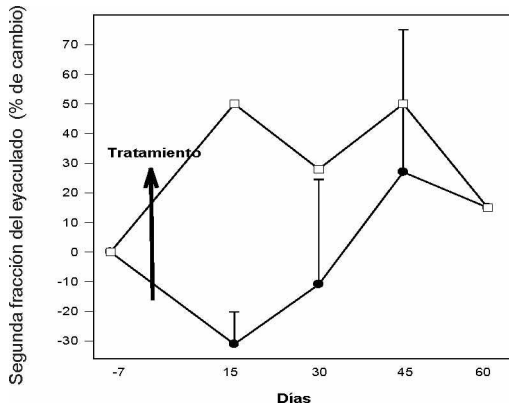
La libido no se vio afectada durante el experimento en ninguno de los animales, salvo en un animal el grupo AZA que en el día 30 la libido se redujo a 2. La consistencia testicular se tornó blanda en otro perro del mismo grupo durante la misma semana. También en el grupo AZA, la testosterona sérica no varió a lo largo del estudio ($P > 0.1$; Figura N° 1) y en ningún animal descendió a niveles basales (< 0.5 ng/ml).

Figura N° 1: Testosterona ($\bar{x} \pm$ SEM de porcentajes de cambio) de la sérica de perros tratados (día 0; flecha) con $375 \mu\text{g}/\text{kg}$ de azaline B (símbolos negros; $n=6$; $P > 0.1$) o diluyente (símbolos blancos; $n=3$).



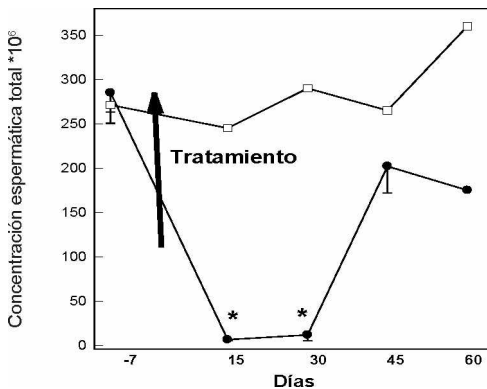
El pH del semen varió entre 6 y 7 en todos los perros durante todo el experimento. Cuando se consideraron únicamente los animales del grupo AZA con un solo testículo el volumen de la segunda fracción del eyaculado no varió a lo largo del experimento ($P > 0.1$; Figura N° 2).

Figura N° 2: Volumen de la segunda fracción del eyaculado ($x \pm SEM$ del porcentaje de cambio) de perros tratados (día 0; flecha) con 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de azaline B (símbolos negros; $n=6$; $P > 0.1$) o diluyente (símbolos blancos; $n=3$).



Un solo perro presentó aspermia el día 30. En este mismo subgrupo de animales el número total de espermatozoides eyaculados varió a lo largo del estudio ($P < 0.01$; Figura N° 3) dado por un descenso del conteo el día 15 al 30 del estudio. Ningún animal presentó azoospermia y uno solo tuvo una concentración $< 1 \cdot 10^6/\text{mL}$ en el día 30.

Figura N° 3: Conteo espermático total de semen eyaculado ($x \pm SEM$) por perros tratados (día 0; flecha) con 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de azaline B (símbolos negros; $n=5$; $P < 0.01$) o diluyente (símbolos blancos; $n=1$). Los asteriscos señalan observaciones significativamente distintas.



En todos los caninos del grupo AZA el porcentaje de espermias vivos ($P < 0.01$; Figura N° 4) y mótilas ($P < 0.01$; Figura N° 5) eyaculadas disminuyó entre los días 15 y 30 del protocolo para retomar a valores iniciales al final del experimento.

Figura N° 4: Porcentaje de espermatozoides vivos ($x \pm SEM$) de perros tratados (día 0; flecha) con 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de azaline B ($n=6$) o diluyente (símbolos blancos; $n=3$). Los símbolos negros corresponden a espermia eyaculado ($P < 0.01$) y los gris a espermias de la cola del epidídimo ($P < 0.01$) de los perros tratados con azaline B. Los asteriscos señalan observaciones significativamente distintas.

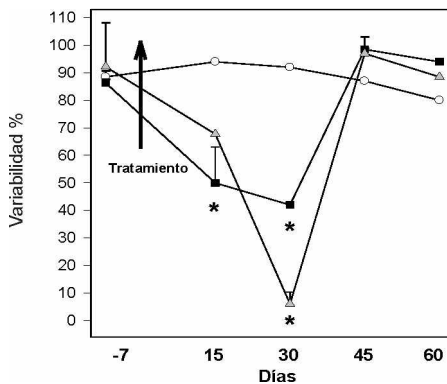
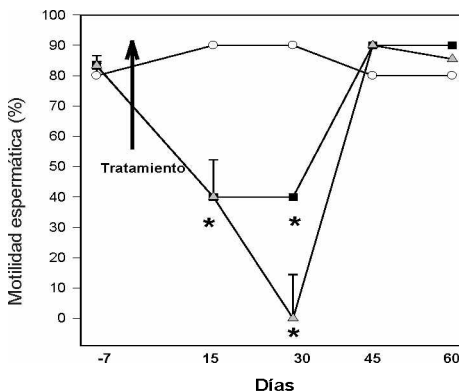


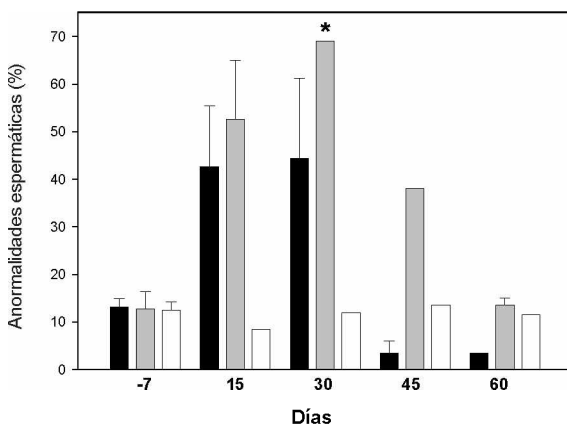
Figura N° 5: Porcentaje de espermatozoides móviles ($x \pm SEM$) de perros tratados (día 0; flecha) con 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de azaline B ($n=5$) o diluyente (símbolos blancos; $n=1$). Los símbolos negros corresponden a espermia eyaculado ($P < 0.01$) y los gris a espermias de la cola del epidídimo ($P < 0.01$) de los perros tratados con azaline B. Los asteriscos señalan observaciones significativamente distintas.



Adagio, L.M.; Rio, F.J.; Hierro, J.A.; Lattanzi, L.D.; García, M.G.; Torres, P.; Menguelle, P.; Meder, A.; Vaquero, P.; Wheeler, J.T.; Corrada, Y.; Gobello, C.

Las morfoanomalías, en este mismo grupo, alcanzaron valores máximos entre los días 15 y 30 del estudio ($P < 0.07$; Figura N° 6) siendo las más frecuentes las colas enrolladas y dobladas y en menor medida las gotas citoplasmáticas distales.

Figura N° 6: Espermatozoides con anomalías morfológicas ($x \pm SEM$ del porcentaje) de perros tratados (día 0; flecha) con 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de azaline B ($n=5$) o diluyente (columnas blancas; $n=1$). Las columnas negras corresponden a espermatozoides eyaculados ($P < 0.07$) y las grises a espermatozoides de la cola del epidídimo ($P < 0.01$) de los perros tratados con azaline B. El asterisco señala una observación significativamente distinta.



En el grupo AZA, cuando se compararon los pesos de los testículos extirpados pretratamiento con los contralaterales izquierdos al día 15 y 30, estos últimos disminuyeron su peso un 27,22% y 17,4%, respectivamente en 2 animales. Contrariamente, los testículos izquierdos aumentaron su peso un 19,8% del día 15 al 45 postratamiento en un perro y del día 15 al 60 un 47,8% en otro animal. En el perro control hubo una disminución del 5% del peso testicular entre los días -15 al 60 en que se realizaron las orquiectomías. Uno de los perros entre día 15 y 30 disminuyó 39,7 %.

Los espermatozoides epididimales del grupo AZA disminuyeron su motilidad ($P < 0.01$; Figura N° 5) y el porcentaje de viabilidad ($P < 0.01$; Figura N° 4) llegando al nadir el día 30 para retomar a valores iniciales al final del experimento. Por su parte en este mismo grupo, las morfoanomalías espermáticas aumentaron ese mismo día ($P < 0.01$; Figura N° 6) para también retomar valores iniciales al finalizar el estudio. Las morfoanomalías más frecuentes de los espermatozoides del epidídimo fueron colas enrolladas, gotas

citoplasmáticas distales y las de cabeza, estas últimas aparecieron los días 15 y 30.

También se encontró una alta correlación entre el porcentaje de motilidad (0.92; P 0.02), viabilidad (0.86; P 0.05) y de formas espermáticas anormales (0.81; P 0.08) entre semen eyaculado y epididimario. Ninguno de los animales presentó efectos colaterales locales ni sistémicos relacionados con los tratamientos.

En los preparados histológicos del grupo AZA ni el diámetro tubular ($P > 0.1$) ni la altura del epitelio seminífero ($P > 0.1$) se modificaron a lo largo del experimento. En este mismo grupo, la cantidad de meiosis del epitelio seminal descendió un 42% y 66%, los días 15 y 30, respectivamente (Figura N° 7), considerando como el 100% la cantidad de meiosis del pretratamiento. Utilizando el mismo sistema de evaluación, en el día 15, los perros tratados con azaline B, disminuyeron la presencia de espermatozoides, espermátides y espermatoцитos un 42%, mientras que el día 30 estas mismas células bajaron un 66% (Figuras N° 8, 9, 10, 11). Por su parte, las células de Leydig también descendieron un 42% y 33,3 % los días 15 y 30 pos aplicación del azaline, respectivamente (Figura N° 12). En todos los casos las células retomaron la cantidad inicial hacia el final del estudio.

Figura N° 7: Cantidad de meiosis en el epitelio seminal de perros tratados (día 0) con 375 µg/kg de azaline B (n=5; columnas negras) o diluyente (n=1; columnas blancas). La cantidad pre-tratamiento (día -7) se tomó como el 100%.

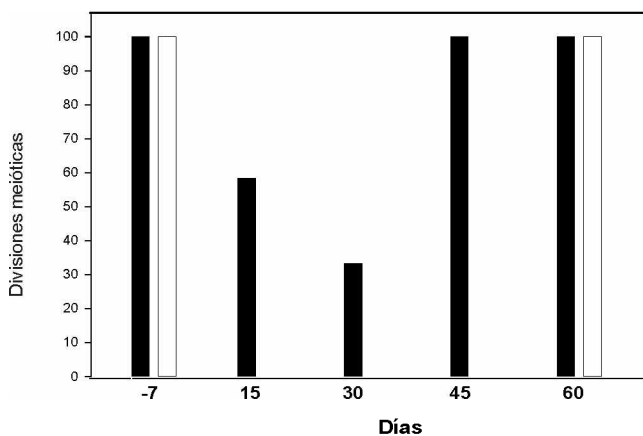


Foto N° 1: Corte histológico de túbulos seminíferos a los 15 días del tratamiento con azaline B (375 $\mu\text{g}/\text{kg}$; H&E 400x). Se observa disminución de los elementos celulares del epitelio seminal: espermatoцитos primarios (Ep), espermátides (Et), espermatozoides (E) y células de Leydig (L).



Foto N° 2: Corte histológico de túbulos seminíferos a los 30 días del tratamiento con azaline B (375 $\mu\text{g}/\text{kg}$; H&E 400x). Se observa disminución de los elementos celulares del epitelio seminal: espermatoцитos primarios (Ep), espermátides (Et), espermatozoides (E) y células de Leydig (L).

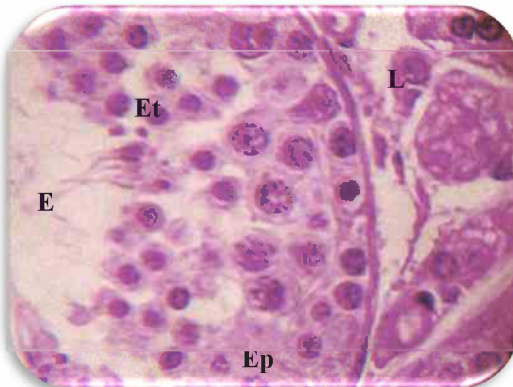


Foto N° 3: Corte histológico de túbulos seminíferos a los 60 días del tratamiento con azaline B (375 µg/kg; H&E 400x). Se observa recuperación total de la altura y celularidad del epitelio seminal: Eg: espermatogonias; Ep: espermatozoides; Es: espermatozoides; Et: espermatozoides; E: espermatozoides.

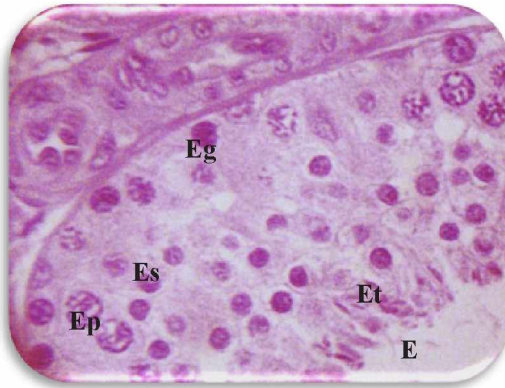
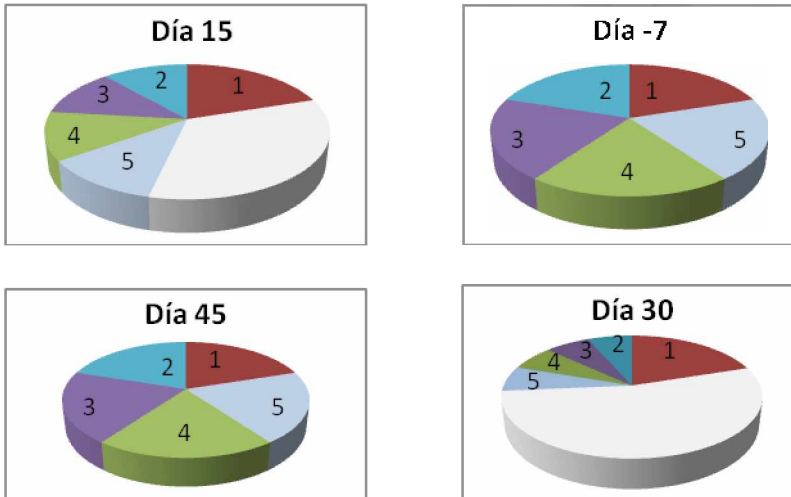
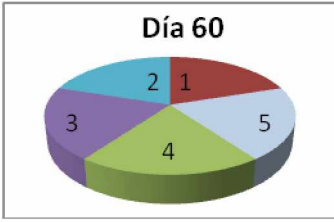


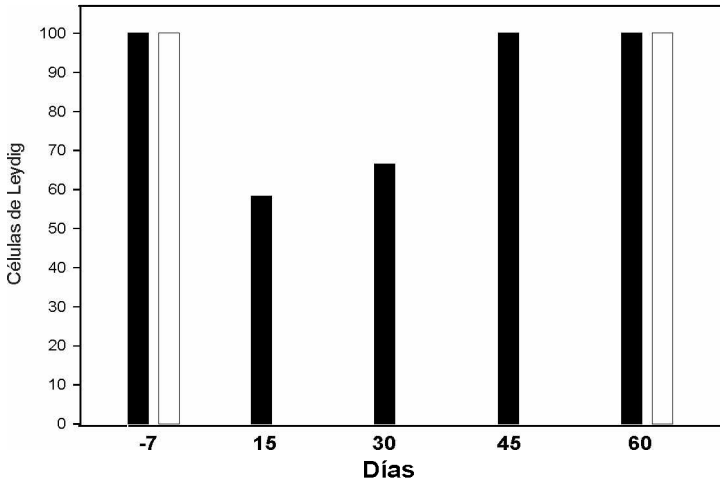
Figura N° 8: Proporción de las distintas células en túbulos seminales de perros tratados (día 0) con 375 µg/kg de azaline B (n=5). La cantidad pretratamiento (día -7) de cada tipo de célula se tomó como el 100%.





- 1: Espermatogonias
- 2: Espermatocitos
- 3: Espermátides redondas
- 4: Espermátides elongadas
- 5: Espermatozoides

Figura N° 9: Cantidad de células de Leydig de perros tratados (día 0) con 375 µg/kg de azaline B (n=5; columnas negras) o diluyente (n=1; columnas blancas). La cantidad pre-tratamiento (día -7) se tomó como el 100%.



\ Discusión \

Los efectos del azaline B sobre la libido y consistencia testicular fueron menores a los reportados en un estudio previo en perros en el que se usó otro antagonista de tercera generación, el acyline a 330 µg/kg (Valiente y col., 2007). Por su parte, al comparar secuencialmente las variaciones de peso de los testículos de los perros tratados con el azaline B se observa un decrecimiento hasta el día 15 para luego comenzar a retomar su peso inicial.

Con este número de animales, los efectos endocrinos del azaline B también parecieron ser más leves que los del acyline (García Romero y col., 2009). En el presente estudio, la testosterona no descendió en ningún momento a niveles basales (pos-castración) como han sido descrito luego de

una única dosis de acyline en esta especie (García Romero y col., 2009). En concordancia el estudio anterior los valores más bajos hallados aparecieron el día 15 pos aplicación del antagonista.

En este trabajo, en el grupo de animales tratados con el azaline B la disminución del volumen seminal fue también leve cuando se la comparó con el descenso hasta la aspermia, en varios perros provocado por el acyline (Valiente y col., 2007). En línea con el estudio previo (Valiente y col., 2007), el conteo espermático se redujo rápidamente entre los días 15 y 30 hacia la oligozoopermia severa sin llegar a la azoospermia en ninguno de los casos. La motilidad y el porcentaje de espermias vivos disminuyeron de manera similar en ambos estudios, mientras que las anomalías morfológicas aparecieron más tempranamente con el azaline B. Además, en este estudio predominaron las anomalías secundarias lo que indica, principalmente, una alteración epididimaria en la maduración. Las características del semen de la cola del epidídimo, si bien se correlacionaron durante todo el estudio con las del eyaculado, presentaron mayor grado de alteración.

No existe a nuestro conocimiento ningún estudio histológico donde se describa el efecto de los antagonistas de GnRH en los túbulos seminíferos caninos. En este trabajo, ni el diámetro tubular ni la altura del epitelio seminífero pareció verse afectada por la droga, a diferencia de lo hallado por García Romero y col. (2012), en gatos medicados con una única dosis de 330 µg/kg SC de acyline donde los valores descendieron significativamente en el día 15 del tratamiento. La cantidad de meiosis y células intra y extra-tubulares estudiadas descendieron entre los días 15 y 30 del experimento. Esto indica un deterioro en la espermatogénesis que cronológicamente coincide con los hallazgos epididimarios y del eyaculado.

Finalmente, al igual que en trabajos previos, en el presente estudio, no se encontraron efectos colaterales locales ni sistémicos atribuidos a los tratamientos (Valiente y col., 2007). Además, todos los parámetros estudiados presentaron una clara tendencia hacia la normalidad a partir del día 30 hacia el final del estudio. La reversibilidad de los efectos seminales de los antagonistas aquí observada fue ampliamente descrita en varias especies incluso el perro (Heber y col., 1982; Page y col., 2006; S'Souza y col., 2004; Gonzalez-Bulnesa y col., 2005; Padula, 2005; Weinbauer, 1984, Valiente y col., 2007).

Se concluye que en este grupo de perros una única aplicación del antagonista de GnRH, azaline B, produjo alteraciones testiculares y seminales reversibles y detectables entre los días 15 y 30 pos tratamiento. Los resultados endocrinos, testiculares e histológicos aquí descritos sumados a la

ausencia de efectos colaterales permiten vislumbrar a los antagonistas de GnRH como drogas futuras en el manejo de la contracepción e enfermedades homonodependientes en el perro.

\ Bibliografía \

- Boothe, H. 1993. Testes and Epididymies. En: Slatter, D. (ed) Textbook of small animal surgery, Saunders RW, Philadelphia, USA. 1331-5.
- Campen, C.A.; Lai, M.T.; Kraft, P.; Kirchner, T.; Phillips, A.; Hahn, D.W.; Rivier, J. 1995. Potent pituitary-gonadal axis suppression and extremely low anaphylactoid activity of a new gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor antagonist „azaline B“. *JBiochem Pharmacol.* 11; 49(9):1313-21
- Chillik, C. 2002. Agonistas y antagonistas de GnRH en reproducción asistida. *Endocrinología Ginecológica y Reproductiva.* 9 (3):22-33.
- D'Souza, S.S.; Selmin, F.; Murty, S.B.; Qiu, W.; Thanoo, B.C.; De Luca, P.P. 2004. Assessment of fertility in male rats after extended chemical castration with a GnRH antagonist. *AAPS Pharm Sci.* 6: E10.
- England, G.; Allen, W. 1989. Seminal characteristics and fertility in the dog. *Vet Rec.* 125: 399.
- García Romero, G.; Valiente, C.; Aquilano, D.; Corrada, Y.; Gobello, C. 2009. Endocrine effects of the GnRH antagonist, acyline, in domestic dogs. *Theriogenology.* 71:1234-7.
- García Romero, G.; Fernández, PE.; Gimeno, E.; Barbeito, C.; Gobello, C. 2012. Effects of the GnRH antagonist acyline on the testis of the domestic cat (*felis catus*). *The Veterinary Journal.* 193:279-282.
- Gobello, C. 2006. Dopamine agonist, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonist and anti-estrogens in canine reproduction: A review. *Theriogenology.* 66(6):1560-1567
- Gobello C. New GnRH analogs in canine reproduction: A review. 2007. *Anim Reprod Sci.* 100(1-2):1-13.
- González Bulnesa, A.; Lopez Sebastiana, A.; García García, R.M.; Veiga Lopez, A.; Souzab, C.J.H.; Mc Neillyc, A.S. 2005. Effecto of the GnRh antagonist, treatment on the gonadotrophin secretion, follicular development and inhibitin A secretion in goats. *Theriogenology.* 88:115-26.
- Heber, D.; Dobson, R.; Swerdloff, R.S.; Channabasavaiah, K.; Stewart, J.M. 1982. Pituitary receptor site blockade by a gonadotropin-releasing antagonist in vivo: mechanism of action. *Science.* 216:420-1.
- Herbst, K.L. 2003. Gonadotrophin releasing hormone antagonists. *Current Opinion in Pharmacology.* 3:1-7.
- Herbst, K.L.; Coviello, A.D.; Page, S.; Amory, J.K.; Anawalt, B.D.; Bremmer, W.J. 2004. A single dose of the potent GnRH antagonist Acyline suppresses gonadotrophins and testosterone for 2 weeks in healthy young men. *J. Clin Endocrinol Metab.* 89(12):5959-65.
- Hoffman, B.; Schuler, G. 2000. Receptors blockers-general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:295-312
- Hull, M.E.; Kenigsberg, D.J. 1987. Gonadotropin releasing hormone: function and clinical use. *Lab. Manag.* 25:51-8.
- Jian, G.C.; Stalewski, J.; Galyean, R.; Dykert, J.; Scheingart, C.; Broqua, P. *et al.* 2001. GnRH antagonist: a new generation of long acting analogues incorporating paraureido-phenylalanines at positions 5 and 6. *J. Med. Chem.* 44:453-67.
- Johnston, S.D. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet Clin North Am (Small Anim Practice).* 21(3): 545-51

- Kutzler, M.; Wood, A. 2006. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*.66(3):514-525
- Olson, P.N. 1991. Clinical approach for evaluating dogs with azoospermia or aspermia. *Vet Clin. North Am (Small Anim Pract)*. 13: 591-08.
- Padula, A.M. 2005. GnRh analogues-agonists and antagonist. *Anim Reprod Sci*; 88:115-26.
- Page, S.T.; Amory, J.K.; Anawalt, B.D.; Bremner, W.J. 2006. Testosterone gel combined with depomedroxiprogesterone acetate is an effective male hormonal contraceptive regimen and is not enhanced by the additions of a GnRH antagonists. *J Clin Endocrinol Metab*. 91: 4374-80.
- Tarlatzis, B.; Kolibianakis, E. 2007. GnRH Agonists vs Antagonists. *Bests Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 21(1):57-65.
- Valiente, C.; Corrada, Y.; de la Sota, P.E.; Gallassi Gerez, P.; Gobello, C. 2007. Effect of the GnRH antagonist, acyline, on canine testicular characteristics. *Theriogenology*. 15; 68(5): 687-2.
- Valiente, C.; García Romero, G.; Gobello, C. 2008. Uso de análogos de GnRH en el control de la reproducción indeseada canina. *Analecta Veterinaria*. 28 (2):45-51
- Valiente, C.; García Romero, G.; Corrada, Y.; de la Sota, P.E.; Hermo, G.; Gobello, C. 2009a. Estrous cycle interruption with a low and a high dose of the GnRH antagonist, acyline, in bitches. *Theriogenology*. 71: 408-11.
- Valiente, C.; Corrada, Y.; de la Sota, P.E.; Blanco, P.; Arias, D.; Gobello, C. 2009b. Comparison of two doses of the GnRH antagonist, acyline, for pregnancy termination in bitches. *Reprod Dom Anim*. 44 (2): 156-159
- Vickery, B.H. 1985. Comparisons of the potential utility of LHRH agonists and antagonists for fertility control. *J. Steroid. Biochem*. 23(5B): 779-91.
- Vickery, B.H.; Nestor, J.J. 1987. LHRH analogues, development and mechanism of action. *Sem Reprod Endocrinol*. 5: 353-70.
- Vickery, B.H.; McRae, G.I.; Goodpasture, J.C.; Sanders, L.M. 1989. Use of Potent LHRH Analogues for Chronic Contraception and Pregnancy Termination in dogs. *J Reprod Fertil*. 39:175-87.
- Weinbauer, G.F.; Surmann, F.J.; Akhtar, F.B.; Shah, G.V.; Vickery, B.H.; Nieschlag, E. 1984. Reversible inhibition of testicular function by a gonadotropin hormone-releasing hormone antagonist in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Fertil Steril*. 42:906-14.
- Wright, P.J.; Verstegen, J.P.; Onclin, K. 2001. The suppression by progestin of oestrus responses of the bitch to the GnRH analogue deslorelin. *J. Reprod. Fertil*. 57:263-8.