

Efectos de la inmunización contra GnRH sobre la estructura y función testicular en perros adultos

✉ Roberto Basulto,¹ César Milanes,² Alain Rojas,³ Franklin Fuentes,¹
Nelson Izquierdo,⁴ José A Bertot,⁴ Héctor Hernández,¹
Delmiro Sánchez,¹ Lesvia Calzada,¹ Jesús Junco¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, P.O. Box 387, Camagüey, Cuba. Telf: 53-32-261295; E-mail: roberto.basulto@cigb.edu.cu ²Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal, Carretera Central Km 21 1/2, Cotorro, Ciudad de La Habana, Cuba. ³Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Stgo de Cuba, Cuba. ⁴Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey, Carretera Circunvalación Norte Km 5 1/2, C.P. 74650, Camagüey, Cuba.

RESUMEN

El empleo de la hormona liberadora de gonadotropina o sus análogos en la inmuno castración reversible de mamíferos brinda grandes posibilidades de éxito en el control de la fertilidad en animales domésticos. En este trabajo se evalúa el efecto biológico, como inmunógeno, de un preparado vacunal sintético denominado GnRHm1-TT sobre los órganos reproductores y la calidad del semen de perros Beagles adultos. Se emplearon 8 perros con una edad de 16-17 meses y un peso entre 9-13 Kg. La muestra se distribuyó de forma aleatoria en dos grupos de 4 animales cada uno. Un grupo se dejó como placebo y el otro recibió dos dosis de 1 mg de este preparado vacunal por vía intramuscular, a 8 semanas una de otra y equivalentes a 0,8 mg de GnRHm1 por animal. Se empleó adyuvante completo e incompleto de Freund en la primera y segunda inmunización respectivamente. El experimento tuvo una duración de 16 semanas. El péptido GnRHm1-TT en la dosis y esquema empleado indujo cambios estructurales y funcionales en los testículos y epidídimos, debidos probablemente a la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-hormona liberadora de gonadotropina sobre la GnRH endógena. Al finalizar la experiencia se dictaminó que los eyaculados de los perros inmunizados se correspondieron con un animal apto para incorporar a la reproducción, otro no apto y otros dos dudosos. Los resultados de los tres últimos perros se debieron, probablemente, a la baja concentración de espermatozoides viables y al elevado porcentaje de espermatozoides patológicos, a diferencia del grupo de los placebos en el que todos los animales se dictaminaron aptos para incorporar a la reproducción. Los resultados obtenidos sugirieron la posibilidad de ensayar, con este péptido, otros esquemas y dosis para lograr una inhibición efectiva de la capacidad reproductiva en perros y otras especies de mamíferos adultos.

Palabras claves: inmunocastración, vacuna de péptido sintético, beagles, GnRH

Biotecnología Aplicada 2003;20:20-24

ABSTRACT

Effects of immunization against GnRH in the structure and function of testicles in adult dogs. The use of GnRH and its analogues for reversible immunological castration in mammals offers great possibilities to achieve successful fertility control in domestic animals. The goal of this work was to evaluate the biological effect of GnRHm1-TT, a synthetic vaccine formulation as an immunogen, on the reproductive organs and semen quality of adult male Beagle dogs. Eight dogs of 16-17 years of age and 9-13 kg, were used. The sample was distributed at random in two groups of four animals each. One group was placebo, and the other received two doses of 1 mg of the formulation with an eight-week interval and equivalent to 0.8 mg of GnRHm1 per animal. Respectively, complete and incomplete Freund adjuvants were used on the first and second immunizations. The experiment lasted 16 weeks. In the doses and scheme used, peptide GnRHm1-TT induced structural and functional changes in testicles and epididymides, probably due to the neutralizing capacity of anti GnRH antibodies on endogenous GnRH. At the end of the experiment it was concluded that the ejaculates from dogs corresponded to one animal ready for reproduction, another not ready, and the other two uncertain. In the three last cases it was caused by low concentration of viable spermatozoa and high percentage of pathological spermatozoa; however, all placebo animals were up for reproduction. The results achieved allow us to suggest the possibility of trying other schemes and doses with this peptide to achieve effective inhibition of the reproductive capacity of dogs and other adult mammal species.

Keywords: immunocastration, synthetic peptide vaccine, beagles, GnRH

Introducción

La castración quirúrgica es el método más empleado para suprimir la capacidad reproductiva de los animales domésticos, ya que es un método muy barato y de rápida realización, además de tener un efecto irreversible. En los perros, por ejemplo, se emplea para prevenir la descendencia no deseada, para evitar y tratar la hiperplasia prostática benigna, la

prostatitis aguda y crónica [1], el cáncer testicular [2] y las enfermedades infecciosas [3].

Una alternativa a la castración quirúrgica es la castración inmunológica, en la que los animales son inmunizados contra la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH o LHRH) [4], molécula clave en el control de la reproducción en los mamíferos [5]. La GnRH es una

1. Krawiec DR. Canine prostate disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1994; 204(10):1561-4.

2. Bastianello SS. A survey on neoplasia in domestic species over a 40-year period from 1935 to 1974 in the Republic of South Africa. VI. Tumours occurring in dogs. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 1983; 50(3):199-220.

proteína propia y demasiado pequeña para atraer la atención del sistema inmune por lo que debe ser presentada mediante el empleo de moléculas portadoras. La inmunocastración es un método menos engorroso, no doloroso, éticamente viable, aplicable a mamíferos de ambos sexos [6-17] y reversible con el tiempo en animales prepúberes y adultos [12]. Otra alternativa publicada para la castración de animales es el uso de análogos de GnRH [18, 19].

La inmunización contra GnRH se ha utilizado en bovinos para evitar la preñez en terneras y vacas en el período previo al sacrificio [6], para evitar la aparición del olor característico que presenta la carne de cerdo [7, 15-16] y para suprimir la actividad ovárica y la conducta sexual durante la época reproductiva en las yeguas [12]. En ratas se publicó la evaluación de una vacuna anti-GnRH para el control de la fertilidad y para tratar de eliminarlas mediante la esterilización de al menos el 70% de la población de ambos sexos en tres generaciones consecutivas [11]. Existen referencias de que en perros se ha desarrollado la inmunocastración neonatal, la cual provoca una supresión completa del sistema reproductivo, sin embargo, no conocemos los resultados de la inmunización contra GnRH en animales adultos de esta especie.

En este trabajo se realizó, por primera vez, la evaluación clínica de los efectos de la administración del preparado vacunal sintético GnRHm1-TT sobre la concentración de testosterona en suero, la calidad del semen y la morfología testicular en perros Beagles adultos.

Materiales y Métodos

Generación y síntesis del péptido GnRHm1-TT

Este péptido se generó por sustitución del aminoácido L-glicina de la sexta posición de la GnRH (QHWSYGLRPG) por una L-prolina (QHWSYPLRPG, GnRHm1) [14]. La variante GnRHm1 y el epítipo T-helper de la toxina del tétano (QYKANSKFIGITEL) (residuos 830-844) [20] fueron sintetizados en tandem con dos glicinas como separadores (QHWSYPLRPGGGQYKANSKFIGITEL). La síntesis se realizó de acuerdo al método de fase sólida [21] sobre resinas MBHA según la estrategia t-Boc/Benzyl.

Animales y conformación de los grupos de trabajo

Se emplearon 8 perros de la raza Beagle con una edad de 16-17 meses y un peso entre 9-13 Kg, los cuales fueron distribuidos de forma aleatoria en dos grupos experimentales (4 animales por grupo). Los mismos se mantuvieron en condiciones de animales de laboratorio con ambiente convencional, agua *ad libitum* y un consumo diario por animal de 400 g de pienso canino.

El pesaje de los animales se realizó mensualmente en una balanza semiautomática marca Rápido (RDA).

Inmunización

En uno de los grupos se le administró, a cada animal, 1 mg del péptido sintético GnRHm1-TT (de los cuales 0,4 mg se correspondieron con GnRHm1) resuspendido en 1 mL de PBS 1X y emulsificado en igual volumen de adyuvante completo de Freund (ACF). En la segunda inmunización se utilizó el mismo inmunógeno, pero el

ACF fue sustituido por el adyuvante incompleto de Freund (AIF). El grupo placebo fue vacunado con PBS 1X y ACF (AIF) en la primera y segunda inmunización respectivamente. La emulsión estable agua en aceite se logró con el uso de un agitador con impelente. En todos los casos las emulsiones fueron preparadas momentos antes de las inmunizaciones.

Se efectuaron dos inmunizaciones por vía intramuscular profunda: en la tabla del cuello (primera inmunización) y en el miembro trasero derecho (segunda inmunización), con un intervalo de 8 semanas entre una y otra. El experimento tuvo una duración de 16 semanas.

Obtención del esperma

Mensualmente se realizaron dos recolecciones de esperma (con intervalos de dos días entre una y otra) a cada perro. Los eyaculados se obtuvieron por manipulación directa sobre los bulbos peneanos en presencia de una perra en celo. La transportación del esperma al laboratorio se realizó en frascos de cristal forrados con papel Kraff. El volumen eyaculado fue medido y registrado y a partir de este, se realizaron las valoraciones espermáticas.

Examen microscópico del semen

La cuantificación de los espermatozoides vivos, a partir del conteo de 100 espermatozoides por muestra, se realizó según el método de Blom [22]. La valoración subjetiva del movimiento masivo de los espermatozoides y la determinación de la concentración espermática se realizó según Holy (1975).

La valoración de las anomalías morfológicas se realizó mediante la tinción con Rojo Bengala-Azul Victoria [22] y con el empleo del microscopio de contraste de fases. Los resultados de ambas técnicas se promediaron para emitir un criterio confiable sobre la proporción de espermatozoides patológicos presentes en el eyaculado.

Concentración de Espermatozoides Viables (C.E.V.)

La concentración de espermatozoides viables se determinó con el empleo de la fórmula:

C.E.V. = Vol. x motilidad x C x % no patológicos, donde: Vol. - volumen del eyaculado (mL); motilidad - % de motilidad de los espermatozoides; C - concentración espermática; % no patológicos - % de espermatozoides no patológicos.

Obtención del suero

Mensualmente se le extrajeron a cada animal 4-5 mL de sangre mediante punción de la vena radial de las extremidades delanteras. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3 200 r.p.m. por 30 min para precipitar los componentes celulares. Los sueros obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su posterior procesamiento.

Seroconversión de anticuerpos anti-GnRH

La seroconversión de anticuerpos anti-GnRH fue determinada mediante un ensayo tipo ELISA. Las placas de microtitulación (poliestireno, Nunc) fueron recubiertas con el péptido GnRH a una concentración de 5 mg/ml en tampón de recubrimiento (carbonato-bicarbonato, pH 9,5) e incubadas en cámara húmeda a 4 °C durante 12 h.

Estas placas se lavaron con solución de Tween 20 al 0,05% en PBS 1X. Posteriormente se añadieron 100 ml

3. Heider HJ. Castration-therapeutic indications. *Kleintierpraxis* 1990; 35(12): 644-50.

4. King JA, Millar RP. Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cel Molec Neurobiol* 1995; 15:5-23.

5. Adelman JP, Mason AJ, Hayflick JS, Seeburg PH. Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. *Pro. Natl Acad Sci USA* 1986; 83:179-83.

6. Hoskinson RM, Rigby RDG, Mattner PE, Huynh VL, D'Occhio M, Neish A, et al. Vaxtrate®: An anti-reproductive vaccine for cattle. *Australian J Biotech* 1990; 4: 166-70.

7. Meloen RH, Turkstra JA, Lankhof H, Puijk WC, Schaaper WMM, Dijkstra G, et al. Efficient immunocastration of male pigs by immunoneutralization of GnRH using a new GnRH-like peptide. *Vaccine* 1994; 12:741-6.

8. Mott MR, Reilly W. Double immunogold labelling demonstrating expression of recombinant genes for production of an anti-fertility vaccine. *Micron* 1994; 25:539-45.

9. Brown BW, Mattner PE, Carroll PA, Hoskinson RM, Rigby RDG. Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on reproductive function and hormones in ewes. *J Reprod Fertil* 1995; 103:131-5.

10. Van der Zee A, Noordegraaf CV, Van den Bosch H, Gielen J, Bergmans H, Hoekstra W, et al. P-fimbriae of *Escherichia coli* as carriers for gonadotropin releasing hormone: development of a recombinant contraceptive vaccine. *Vaccine* 1995; 13:753-8.

11. Miller LA, Johns BE, Elias DJ, Crane KA. Comparative efficacy of two immunocastrative vaccines. *Vaccine* 1997; 15(17/18):1858-62.

12. Tshewang U, Dowsett KF, Knott LM, Trigg TE. Preliminary study on ovarian activity in fillies treated with a GnRH vaccine. *Aust Vet J* 1997; 75(9):663-7.

13. Malmgren L, Andresen O, Dalin AM. Effects of GnRH immunization on hormonal levels, sexual behaviour, semen quality and testicular morphology in mature stallions. *Equine Vet J* 2001; 33(1):75-83.

14. Bringas R, Basulto R, Reyes O, de la Fuente J. Vaccine for the reversible immunocastration of mammals. International application published under the patent cooperation treaty (PCT). Int. publ. no. WO 98/27111. 1998 Jun 25.

15. Oonk RB, Turkstra JA, Schaaper WM, Erkens JHF, Schuitemaker-de Weerd MH, Van Nes A, et al. New GnRH-like peptide construct to optimize efficient immunocastration of male pigs by immunoneutralization of GnRH. *Vaccine* 1998; 16:1074-82.

16. Beekman NJCM, Schaaper WMM, Turkstra JA, Meloen RH. Highly immunogenic and fully synthetic peptide-carrier constructs targeting GnRH. *Vaccine* 1999; 17:2043-50.

17. Zhang Y, Rozell TG, deAvila DM, Bertrand KP, Reeves J. Development of recombinant ovalbumin-luteinizing hormone releasing hormone as a potential sterilization vaccine. *Vaccine* 1999; 17:2185-91.

por pocillo de la solución de bloqueo PBS 1X, 2% de Seroalbúmina Bovina y se incubaron durante 1 h a 37 °C.

Se repitió el mismo proceso de lavado. A cada pocillo se le añadieron 100 ml del suero a analizar, disuelto en PBS 1X, 1% de Seroalbúmina Bovina y 0,05% de Tween 20. Las placas se incubaron durante 2 h a 37 °C. Luego de los lavados correspondientes, el anticuerpo policlonal anti IgG canina en carnero, conjugado con peroxidasa fue añadido en la dilución de trabajo (1/500) y las placas incubadas 1 h a 37 °C.

La reacción antígeno-anticuerpo se detectó con la adición del sustrato cromogenito Ortofenilendiamina (OPD) disuelto en tampón sustrato (fosfato dibásico de sodio 0,02 M, pH 5, que contiene 10 ml de peróxido de hidrógeno al 30%) e incubación a temperatura ambiente por 30 min. La reacción se detuvo por adición de ácido sulfúrico 2,5 N. La lectura de los resultados se realizó a 492 nm con el lector de placas de microtitulación (Multiscan, Labsystem, Finlandia). Las muestras positivas fueron consideradas aquellas cuyos valores de absorbancia estuvieron por encima de la línea de corte del ELISA (0,23), equivalente a la media de la absorbancia de 15 sueros negativos más 3 desviaciones estándares.

Determinación de testosterona

La concentración de testosterona en suero se determinó en la semana 16 con el juego de reactivos TESTO-CIT2 (CIS Bio International, France).

Histología

Para la eutanasia, a los perros se les aplicó 5 ml de anestésico local (clorhidrato de lidocaina, Labiofam, Cuba) en la base del cerebro entre la vértebra atlas y el área occipital, el cual produjo un paro cardio-respiratorio instantáneo que garantizó una muerte sin sufrimientos según requisitos éticos.

Los testículos y epidídimos fueron extraídos y pesados en una balanza analítica (Sartorius, A-120S). El volumen de cada testículo se midió por desplazamiento de agua destilada en una probeta graduada.

Para el examen histológico se tomaron muestras de las secciones transversales de los epidídimos y de la sección media de los testículos. Todas estas muestras fueron fijadas en formol al 10%, incluidas en parafina y cortadas con un espesor de 6 µm. La coloración empleada fue la hematoxilina y eosina.

Análisis estadístico

En el análisis estadístico de los resultados se empleó la prueba F para varianza de dos muestras y la prueba t de Student. Los resultados de dos análisis fueron considerados significativos para valores de $P < 0,05$.

Resultados

Peso corporal de los animales

Durante el experimento no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) para las medias de los pesos corporales de los animales placebos e inmunizados.

Espermatozoides viables y patológicos

Los perros inmunizados con GnRHm1-TT, en comparación con los placebos, mostraron un aumento del número de espermatozoides patológicos a partir de la primera vacunación, que fue significativo en la semana

4 y por otra parte, una disminución de la concentración de los espermatozoides viables, a partir de la segunda vacunación que fue estadísticamente significativa en la semana 16 (Figura 1). La anomalía morfológica más frecuente en la cabeza de los espermatozoides resultó ser el capuchón desprendiéndose, mientras que en la parte intermedia se detectó fundamentalmente la gota protoplasmática.

Seroconversión de anticuerpos anti-GnRH

Los perros inmunizados con GnRHm1-TT mostraron un aumento en la seroconversión de anticuerpos anti-GnRH a partir de la semana 3. En la semana 12 se obtuvo el valor máximo de absorbancia (492 nm) igual a 0,457 (Figura 2). Al finalizar el experimento los valores de absorbancia, en los animales inmunizados, se mantuvieron por encima de la línea de

18. Reid J, Dufour JJ, Sirard MA. Effect of a single injection of a long-acting gonadotrophin-releasing hormone agonist on prepubertal male and female pigs on reproduction organs, growth performance and sensory qualities of pork roasts. *Reprod Nutr Dev* 1996; 36:321-32.

19. Lacoste D, Dubé D, Trudel C, Bélanger A, Labrie F. Normal gonadal functions and fertility after 23 months of treatment of prepubertal male and female dogs with the GnRH agonist [D-Trp₆, des-Gly-NH₂10]GnRH ethylamide. *J Androl* 1989; 10:456-65.

20. Panina-Bordignon P, Tan G, Termijtelen A, Demotz S, Corradin G, Lanzavecchia A. Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol* 1989; 19:2237.

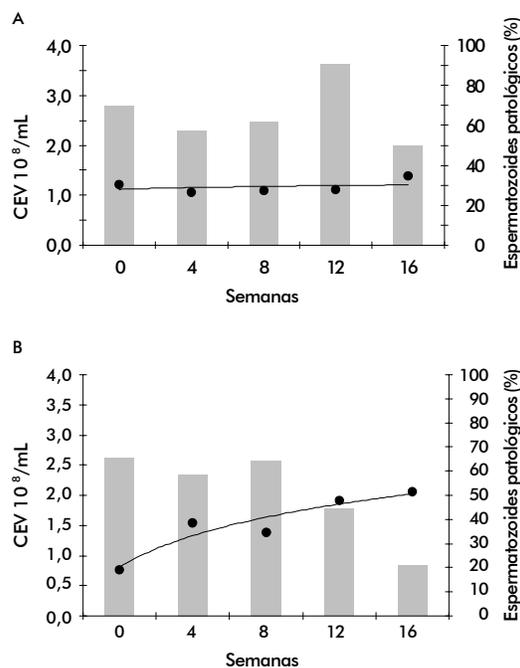


Figura 1. Concentración media de espermatozoides viables, CEV (■) y espermatozoides patológicos (●) para el grupo de animales placebos (A) e inmunizados (B). Las inmunizaciones con GnRHm1-TT se realizaron en la semana 0 y 8.

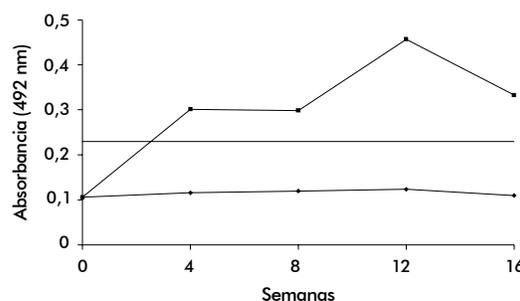


Figura 2. Seroconversión de anticuerpos anti-GnRH durante el esquema de inmunización. La línea de corte del ensayo se corresponde con el valor de absorbancia de 0,23. Los valores son expresados como la media de cuatro animales. Símbolos: animales placebos (♦) e inmunizados (■) y línea de corte (—).

corte, mientras que en los placebos se mantuvo siempre por debajo.

Examen macroscópico de los órganos reproductivos

En ambos grupos experimentales no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) para las dimensiones y los pesos de los testículos y epidídimos.

Determinación de la concentración de testosterona

Como se muestra en la Figura 3, la concentración de testosterona en el suero de los animales inmunizados resultó significativamente inferior al de los placebos en las semanas 4 ($P < 0,01$) y 16 ($P < 0,05$).

Histología

Los testículos de los animales del grupo placebo (Figura 4A) mostraron todos los estadios de las células sexuales masculinas, con presencia de espermatozoides en la luz de los mismos. En los epidídimos, la mayoría de los conductos mostraron gran cantidad de contenido espermático. Sin embargo, los testículos de los perros inmunizados (Figura 4B) presentaron un aumento del tejido intersticial al estar disminuidos los diámetros de los túbulos seminíferos a causa de procesos degenerativos, que avanzaron desde el centro hacia la periferia de los túbulos. Esta degeneración se presentó en algunos túbulos de forma incipiente (tres animales), y en otros generalizada (un animal). En el caso de degeneración testicular generalizada no se observaron espermátides ni espermatozoides y los epidídimos no mostraron contenido espermático en la luz.

Discusión

En este experimento el peso corporal de los animales inmunizados no difirió de los placebos. Esta observación fue similar a los resultados de Brown [9] en ovejas inmunizadas contra GnRH y al de Reid [17] en cerdos tratados con un agonista de GnRH. Por otra parte, el peso y volumen de los órganos reproductores de los animales inmunizados con GnRHm1-TT no mostraron diferencias significativas al ser comparados con los del grupo placebo, lo que demostró que la inmunización con el esquema y

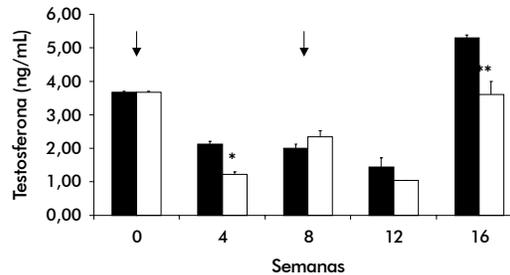


Figura 3. Niveles de testosterona (media \pm desviación estándar) en el suero de los animales placebos (■) e inmunizados con GnRHm1-TT (*). * $P < 0,01$, ** $P < 0,05$, en comparación con el grupo placebo. ↓, Inmunizaciones realizadas.

dosis empleada no ocasionó daños macroscópicos a los animales tratados.

En los animales inmunizados con GnRHm1-TT la seroconversión de anticuerpos anti-GnRH alcanzó su máximo valor 4 semanas después de la segunda inmunización (Figura 2). Resultados similares se encontraron en ovejas [9] y cerdos prepúberes [7], en los que el pico máximo de anticuerpos anti-GnRH se alcanzó 2 y 4 semanas después de la segunda inmunización respectivamente, relacionado con el efecto re-estimulador ejercido por la segunda vacunación (semana 8).

La concentración media de testosterona en el suero de los perros placebos, se correspondió con los valores publicados por DePalatis y colaboradores [23], quienes observaron una fluctuación de la concentración de la testosterona en el suero de los perros adultos intactos en un rango entre 0,4 y 6,0 ng/mL en un período de 24 horas. En este trabajo, la concentración de testosterona en el suero de los animales inmunizados disminuyó después de la primera y segunda administración del preparado vacunal.

Los procesos degenerativos que se presentaron en los túbulos seminíferos, y que afectaron fundamentalmente las espermátides y espermatozoides, se corroboraron al comparar la concentración media de espermatozoides viables entre los animales no tratados y los inmunizados (Figura 1). Además de las anomalías morfológicas descritas, en los eyaculados de un animal inmunizado, se observaron (a partir de la segunda inmunización) en for-

21. Houghten RA, DeGraw ST, Bray MK, Hoffmann SR, Frizzell ND. Simultaneous multiple peptide synthesis: the rapid preparation of large numbers of discrete peptides for biological, immunological, and methodological studies. *BioTechniques* 1986; 4:522-6.

22. Holy L. Biología de la reproducción bovina. Cuarta edición. Cuba: Instituto Cubano del Libro; 1975.

23. DePalatis L, Moore J, Falvo RE. Plasma concentrations of testosterone and LH in the male dog. *J Reprod Fert* 1978; 52:201-7.

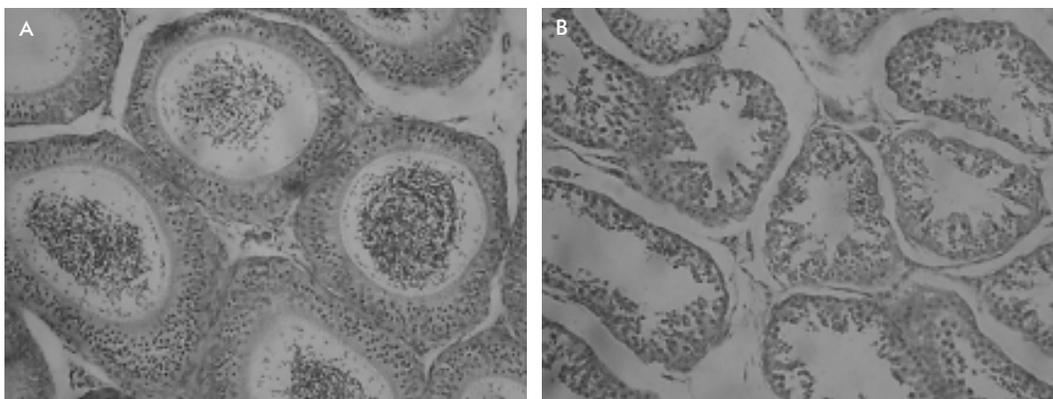


Figura 4. Secciones transversales de los testículos de los perros 8 semanas después de la segunda inmunización. (A) En la mayoría de los túbulos seminíferos se observan varios tipos de células germinales y espermatozoides (animal placebo), (B) El diámetro y el número de las células germinales está disminuido en todos los túbulos seminíferos (animal inmunizado). (x40).

ma aislada, células espermiogénicas (espermocitos y espermátides), características de procesos degenerativos avanzados, que evidenciaron que no existió una estimulación adecuada para la división de las células germinales, debido a que la producción de testosterona se encontraba afectada posiblemente por la insuficiencia de la hormona luteinizante (LH).

En esta investigación los animales inmunizados mostraron daños en la estructura de los testículos, lo que pudiera indicar que la GnRH endógena fue bloqueada por los anticuerpos detectados en la seroconversión hacia GnRH.

El alto porcentaje de espermatozoides patológicos en los eyaculados de los perros inmunizados, fue posible resultado de cambios en el medio en que ocurre la espermación. La anomalía morfológica más frecuente resultó ser el capuchón desprendiéndose, fenómeno que se desarrolla sólo después de formado el espermatozoide y posiblemente como consecuencia de un ambiente inadecuado [22]. En la parte intermedia de los espermatozoides, muy necesaria para la fecundación, se detectó fundamentalmente la gota protoplasmática, característica de espermatozoides inmaduros. Estas anomalías pueden ser el reflejo de una insuficiente estimulación, por parte de la FSH, de las células de Sertoli, responsables de la diferenciación de las espermátides en espermatozoides.

En los animales inmunizados con GnRHm1-TT, como resultado de las alteraciones antes mencionadas, disminuyó el por ciento de espermatozoides vivos y la concentración de espermatozoides viables

en las dos últimas extracciones espermáticas realizadas (Figura 1). En las evaluaciones espermáticas realizadas 2-3 meses antes de comenzar la experiencia aquí descrita todos los perros estaban aptos para incorporar a la reproducción (estos resultados no se muestran). Sin embargo, en la valoración del semen, realizada en la semana 16, se dictaminó que los eyaculados de los perros inmunizados se correspondieron con un animal apto para incorporar a la reproducción, otro no apto y otros dos dudosos, debido a la baja concentración de espermatozoides viables y al elevado porcentaje de espermatozoides patológicos (Figura 1). Por otra parte, en el grupo de los placebos todos los animales se dictaminaron aptos para incorporar a la reproducción.

El péptido GnRHm1-TT en la dosis y esquema empleado indujo cambios estructurales y funcionales en los testículos y epidídimos, debido probablemente a la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-GnRH sobre la GnRH endógena. Los resultados obtenidos permiten sugerir la posibilidad de ensayar, con este péptido, otros esquemas y dosis para lograr una inhibición efectiva de la capacidad reproductiva en perros y otras especies de mamíferos adultos.

Agradecimientos

A Osvaldo Reyes por la síntesis y purificación de los péptidos GnRH y GnRHm1-TT y a Eddy Bover por su valiosa ayuda en el procesamiento estadístico de los resultados.

Recibido en Octubre de 2001. Aprobado en Febrero de 2003.