

## INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD TESTICULAR PRECOZ EN RATAS, MEDIANTE ADMINISTRACIÓN PULSÁTIL DE LHRH<sup>1</sup>

PRECOCIUS TESTICULAR ACTIVITY INDUCTION IN RATS BY PULSATIL LHRH ADMINISTRATION

SOLEDAD TASCON<sup>2</sup>, SANTIAGO PEREDO<sup>2</sup> Y SERGIO RECABARREN<sup>3</sup>

### SUMMARY

*Groups of immature male rats received different doses, frequency and duration of subcutaneously administered LHRH to determine its effect upon the onset of testicular activity.*

*Upon completion of the experiment the animals were killed and their testis were weighed, fixed and treated with routine microtechniques for light microscopy. By microscopic examination it was measured the seminiferous tubule diameter, height and evolution of germinal epithelium and Leydig cell diameter. These parameters were used to evaluate spermatogenesis initiation.*

*It was observed that animals injected with three daily pulses of 500 ng LHRH in saline gel showed a precocious spermatogenetic activity. On the contrary, those rats which received 40 ng of LHRH in saline solution nine times daily showed a decreased testicular activity even lower than that of the control group, being this last treatment the less effective to trigger spermatogenesis onset.*

### INTRODUCCIÓN

La pubertad en mamíferos se caracteriza por la activación del eje hipotálamo-hipofisiario. Sin embargo, los factores determinantes del inicio de la pubertad en los animales no están bien caracterizados. El conocimiento de los fenómenos que estimulan el inicio de la pubertad, permitiría su manipulación con el fin de lograr un mayor período reproductivo, en especial en animales de importancia económica para el hombre. Los eventos endocrinos que culminan con la pubertad en la rata macho podrían

ser comunes a otras especies animales y por esta razón en el presente trabajo se presenta a la rata como modelo experimental.

En la rata macho, el inicio de la pubertad se reconoce cuando los primeros espermios son liberados del epitelio germinal. Externamente este evento se correlaciona con la separación prepucial (Korenbrodt *et al.*, 1977; Ramaley, 1979).

Las gonadotropinas serían las responsables de iniciar la cadena de eventos que resulta en la espermatogénesis normal y la madurez sexual (Kragt *et al.*, 1972). Si se considera que la

<sup>1</sup>Financiado por Proyecto 2.84.3, Dirección de Investigación Universidad Católica de Chile. Sede Temuco y parcialmente por Proyecto 20.24.02, Dirección de Investigación Universidad de Concepción.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Naturales. Pontificia Universidad Católica de Chile. Sede Regional Temuco.

<sup>3</sup>Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Animal. Departamento de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad de Concepción.

Publicación aprobada por el Comité Editor de la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Chile con el N° 467/89. Fecha de recepción: 27 de enero de 1989.

LHRH libera tanto LH como FSH, un medio de inducir pubertad precoz sería a través de la administración exógena de la neurohormona durante el período prepuberal.

Estudios en monas, toros y carneros (Wildt *et al.*, 1980; Mongkonpunya *et al.*, 1975; Schanbacher *et al.*, 1982, 1983; Lincoln, 1979) sugieren que es necesaria la experimentación con una selección de dosis, frecuencia y vehículo de administración de LHRH, con el fin de estimar el efecto de la estimulación de la LHRH durante el período prepuberal.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de diferentes regímenes de administración de LHRH durante el período prepuberal en ratas machos en el inicio precoz de la actividad espermatogénica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas machos prepúberes (*Rattus norvegicus*), obtenidas de la colonia existente en el bioterio del Departamento de Ciencias Naturales de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Sede Temuco. Para ello se cruzaron hembras adultas con machos de fertilidad comprobada manteniéndose en condiciones controladas de temperatura (22°C), y luz (10 horas de luz, 14 horas de oscuridad) con agua y alimento *ad libitum*.

Luego del nacimiento, las camadas se homogeneizaron con el fin de dejar ocho animales por madre despreciando el exceso de crías hembras. Las crías se mantuvieron con la madre en jaulas individuales hasta el destete (21 días de edad).

Los animales fueron identificados con marcas en las orejas y seleccionados al azar para su utilización en diferentes tratamientos, los cuales se aplicaron desde el quinto día de edad. Los animales fueron asignados a cinco grupos. El grupo A recibió 40 ng LHRH/100 g de peso corporal por vía subcutánea por 11, 21 y 31 días con frecuencia de 9 pulsos diarios. El grupo B recibió la misma dosis con una frecuencia de 5 pulsos diarios por 11, 21 y 31 días. El grupo C recibió la misma dosis que los grupos A y B, con una frecuencia de tres pulsos diarios por 11, 21 y 31 días. El grupo D recibió 500 ng LHRH/100 g de peso corporal vía subcutánea con una frecuencia de tres pulsos dia-

rios durante 11, 21 y 31 días. La LHRH en este caso fue diluida en gel salino al 8% (p/p).

El grupo control (tratamiento E) recibió suero salino (0,9%) vía subcutánea durante 11, 21 y 31 días con una frecuencia de nueve pulsos diarios.

En cada grupo se trataron como mínimo ocho animales y todas las inyecciones fueron aplicadas en un volumen total de 0,1 ml.

Al término de cada tratamiento, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Inmediatamente se extrajeron los testículos y vesículas seminales, los cuales fueron pesados. Se midió el ancho y la longitud del testículo. Posteriormente los testículos fueron fijados durante 18 horas en Bouin alcohólico, según la modalidad de Pantin (Humason, 1962) y preservados en alcohol al 70% hasta su posterior inclusión en parafina sólida. Se hicieron cortes seriados de 7 µm de grosor, los que fueron teñidos en forma semiseriada con hematoxilina-eosina (Humason, 1962).

Los cortes histológicos fueron observados al microscopio y se midió el diámetro del túbulo seminífero, el diámetro del núcleo de las células de Leydig y la altura del epitelio germinal (mediante micrómetro ocular, considerando la distancia entre la membrana basal del túbulo y el estrato de células apicales que delimitan la luz del túbulo. En el caso de espermátidas se mide hasta el punto de la inserción de la cola. En el caso de espermatozoides se mide hasta el punto de inserción de la cabeza. En aquellos casos donde el cordón seminífero no tiene lumen, se mide el diámetro tubular en corte transversal y se divide por 2. Además, se efectuó un análisis cualitativo de la morfología de los diversos estados celulares dentro de la evolución espermatogénica (Setchell, 1970). Los datos fueron procesados con un análisis de Varianza para mediciones repetidas y las medidas comparadas entre sí mediante el test de Newman-Keuls. Los datos se entregan como promedio ± error estándar de la media. Un  $P < 0,05$  se consideró como estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de peso corporal, ganancia de peso diario, peso

C U A D R O 1  
PESOS DE DIFERENTES PARÁMETROS EN ANIMALES TRATADOS Y CONTROL AGRUPADOS DE ACUERDO A LA EDAD EL DÍA DEL SACRIFICIO. LOS DATOS DE PESO CORPORAL Y LOS DE GANANCIA DE PESO DIARIO CORRESPONDEN A LOS REGISTRADOS EL ÚLTIMO DÍA DEL TRATAMIENTO. LOS VALORES REPRESENTAN EL PROMEDIO ± E.E.

*Weight of different parameters from treated and control animals according to their age at the killed. The body weight and daily of treatment. Data represent the mean ± S.E.*

Tratamiento	Edad (días)	Peso corporal (g)	Ganancia de peso diario (g)	Peso testicular (g/100 g de peso corporal)	Peso del epidídimo (mg/100 g de peso corporal)	Peso de la vesícula seminal (mg/100 g de peso corp.)
A	16	30 ± 1,9	1,9 ± 0,14	0,17 ± 0,01	58 ± 10,4	8 ± 1,1
B		28 ± 2,2	1,7 ± 0,18	0,18 ± 0,03	84 ± 11,1	12 ± 1,9
C		28 ± 1,5	1,8 ± 0,1	0,17 ± 0,01	68 ± 8,0	10 ± 1,7
D		29 ± 1,6	1,7 ± 0,13	0,17 ± 0,01	64 ± 6,5	13 ± 5,1
Control		28 ± 1,1	1,7 ± 0,09	0,16 ± 0,01	72 ± 8,3	7 ± 1,1
		N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
A	26	47 ± 1,8c	1,8 ± 0,08a	0,33 ± 0,02	72 ± 11,0c	10 ± 1,7
B		54 ± 2,3	2,2 ± 0,1	0,33 ± 0,01	78 ± 4,4	10 ± 1,4
C		57 ± 4,3	2,3 ± 0,2	0,34 ± 0,03	110 ± 17,0a	9 ± 1,2
D		62 ± 4,8a	2,5 ± 0,21c	0,33 ± 0,02	67 ± 8,1c	11 ± 1,7
Control		53 ± 3,5	2,2 ± 0,21	0,34 ± 0,02	73 ± 10,2c	10 ± 1,3
				N/S		N/S
A	36	93 ± 4,4c	2,8 ± 0,14c	0,39 ± 0,03	95 ± 9,3	13 ± 2,4
B		98 ± 5,5	2,9 ± 0,17	0,42 ± 0,02	77 ± 9,5	9 ± 1,2
C		109 ± 4,8a	3,4 ± 0,19a	0,41 ± 0,02	120 ± 32,0	14 ± 2,1
D		102 ± 4,5	3,0 ± 0,14	0,54 ± 0,09	95 ± 16,7	18 ± 5,9
Control		95 ± 4,3	2,8 ± 0,17c	0,47 ± 0,03	88 ± 5,5	12 ± 1,2
				N/S	N/S	N/S

a, c:  $P < 0,05$ .

N/S: no significativo.

testicular, peso del epidídimo y de vesículas seminales.

### Peso corporal y ganancia de peso diario

No se observaron diferencias significativas entre el peso corporal de las ratas tratadas por 11 días con LHRH respecto al grupo control. Sin embargo, los animales de 26 días de edad sometidos por 21 días a los diferentes tratamientos presentaron diferencias significativas entre los grupos D y A ( $P < 0,05$ ), al igual que las ratas de 36 días de los grupos C y A ( $P < 0,05$ ). En cuanto a la ganancia de peso diario entre los animales tratados y controles, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos A y D ( $P < 0,05$ ) y C y A, C y

control ( $P < 0,05$ ) en los animales de 26 y 36 días de edad, respectivamente.

### Peso testicular

Las infusiones intermitentes de LHRH a diferentes dosis, frecuencias y medios de infusión no influyeron en el peso testicular/100 g de peso corporal, aun cuando hubo un mayor peso del grupo D respecto del A en el tratamiento por 31 días.

### Peso del epidídimo y vesícula seminal

Al hacer un estudio comparativo de los pesos del epidídimo entre los animales tratados y el grupo control, a los 26 días de edad, se pudo

## C U A D R O 2

EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS HISTOLÓGICOS DE ANIMALES TRATADOS Y CONTROL CON DIFERENTES EDADES AL DÍA DEL SACRIFICIO.

LOS VALORES CORRESPONDEN AL PROMEDIO  $\pm$  E.E.

*Histological parameters evaluation in treated and control animals with different ages at the sacrifice day.*

*Data represent the mean values  $\pm$  S.E.*

Tratamiento	Edad (días)	Diámetro del túbulo seminífero ( $\mu\text{m}$ )	Altura del epitelio germinal ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro del núcleo de las células de Leydig ( $\mu\text{m}$ )
A	16	66 $\pm$ 1,9b	24 $\pm$ 0,8a	5,4 $\pm$ 0,1 a
B		69 $\pm$ 2,3	31 $\pm$ 0,3c	4,6 $\pm$ 0,3 xb
C		78 $\pm$ 1,6a	28 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,1 xb
D		68 $\pm$ 3,1b	32 $\pm$ 3,4b	4,3 $\pm$ 0,03 b
Control		67 $\pm$ 1,6b	26 $\pm$ 0,6d	4,0 $\pm$ 0,1 yb
A	26	110 $\pm$ 4,5	45 $\pm$ 1,0a	4,3 $\pm$ 0,1 b
B		128 $\pm$ 7,0	57 $\pm$ 3,9b	7,3 $\pm$ 1,2 a
C		121 $\pm$ 10,5	53 $\pm$ 2,6c	5,1 $\pm$ 0,1 c
D		118 $\pm$ 3,1	55 $\pm$ 0,8b	4,3 $\pm$ 0,04b
Control		116 $\pm$ 4,1	51 $\pm$ 1,7	4,5 $\pm$ 0,1 b
		N/S		
A	36	150 $\pm$ 9,4	58 $\pm$ 2,1b	6,1 $\pm$ 0,8 a
B		152 $\pm$ 7,8	60 $\pm$ 2,5b	4,8 $\pm$ 0,2 c
C		164 $\pm$ 4,6	62 $\pm$ 2,6a	5,0 $\pm$ 0,1 c
D		160 $\pm$ 6,3	74 $\pm$ 1,3a	4,4 $\pm$ 0,04b
Control		160 $\pm$ 7,3	66 $\pm$ 2,8	5,0 $\pm$ 0,07c
		N/S		

b, d; x, y; a, c:  $P < 0,05$ .

a, b:  $P < 0,01$ .

N/S: no significativo.

apreciar un peso mayor en el grupo C respecto de los grupos A, D y control ( $P < 0,05$ ) (Cuadro 1). En cambio, en los animales de 16 y 36 días de edad no se observaron diferencias significativas de peso, aunque se observó una tendencia a que el peso del epidídimo fuese mayor en el grupo C a los 36 días de edad.

En el análisis realizado a los pesos de las vesículas seminales no se observaron diferencias significativas.

#### Histología testicular

En el Cuadro 2 se presentan los resultados en relación al diámetro del túbulo seminífero, altura del epitelio germinal y diámetro del núcleo de las células de Leydig.

#### Diámetro de túbulo seminífero

Al analizar los datos se desprende que, a los

16 días de edad y después de 11 días de tratamiento, el diámetro tubular fue mayor en el tratamiento C ( $P < 0,01$ ) con respecto a los grupos A, D y control (Fig. 3).

En las ratas de 26 y 36 días no se detectaron diferencias significativas entre el grupo control y los demás tratamientos y de éstos entre sí (Figs. 1 y 2).

#### Altura del epitelio germinal

Se encontró que la altura del epitelio germinal es menor en el grupo A respecto al D y B ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,05$ ) y que es mayor en el grupo D con respecto al control ( $P < 0,05$ ) en ratas tratadas durante 11 días (Cuadro 2).

A los 26 días de edad se observó que las ratas sometidas al tratamiento A presentaron menor altura del epitelio con respecto al grupo B y D ( $P < 0,01$ ) y en menor grado con el C

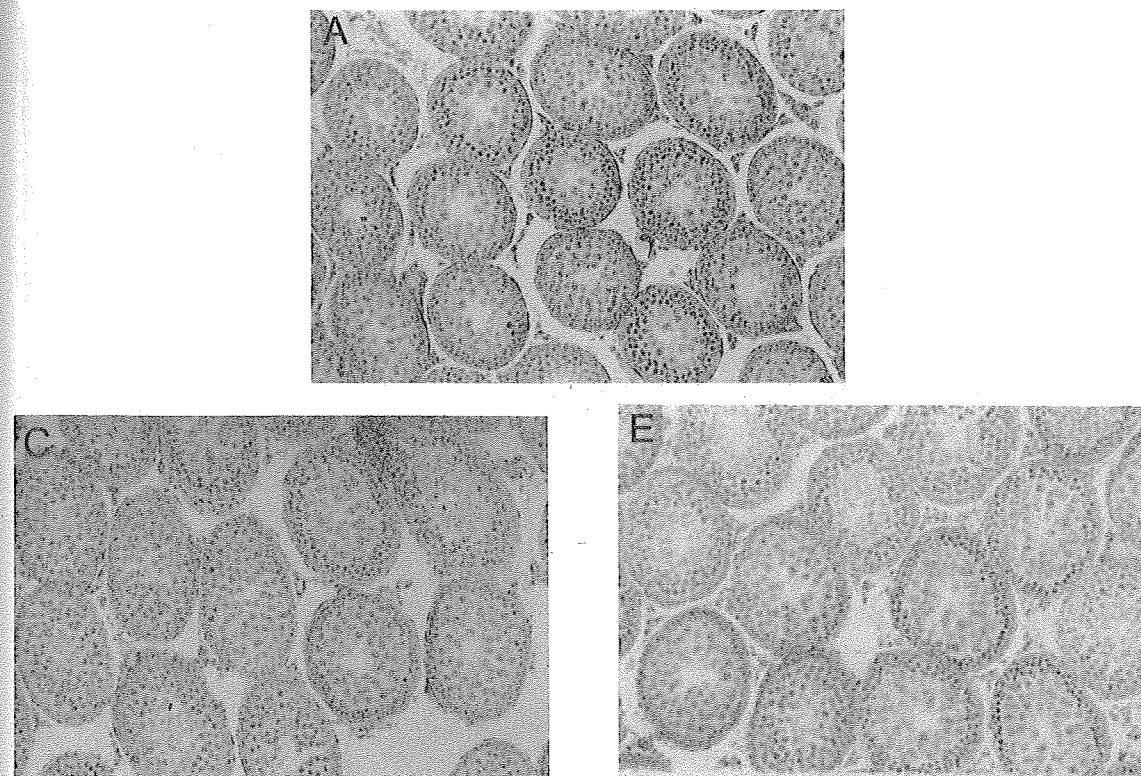


FIGURA 1

VISTA PANORÁMICA DE SECCIONES TESTICULARES DE ANIMALES TRATADOS Y CONTROL SACRIFICADOS A LOS 26 DÍAS DE EDAD, QUE MUESTRAN EL CRECIMIENTO DEL TÚBULO SEMINÍFERO ( $\times 50$ ) EN LOS TRATAMIENTOS A, C Y E, RESPECTIVAMENTE.

*Topographical view of testis sections of treated and control animals sacrificed at 26 days that show the seminiferous tubules growth in A, C and E treatment respectively ( $\times 50$ ).*

( $P < 0,05$ ). A los 36 días de edad la mayor altura del epitelio germinal corresponde a los animales del grupo D con respecto al A y B ( $P < 0,01$ ) y C ( $P < 0,05$ ) (Cuadro 2).

Así, entonces, el tratamiento D muestra una mayor estimulación en el crecimiento de la altura del epitelio germinal respecto del control y los demás grupos tratados, en cambio, el grupo A muestra el efecto contrario.

#### Diámetro del núcleo de las células de Leydig

El diámetro del núcleo de las células de Leydig se eligió como parámetro de la actividad testicular debido a que relaciona el volumen del núcleo con el estado funcional de la célula. Un mayor tamaño del núcleo indica

mayor actividad celular, independientemente del aspecto del citoplasma.

Los núcleos de las células de Leydig en animales de 16 días de edad, presentan mayor diámetro en las ratas correspondientes al tratamiento A respecto a los grupos B, C, D y control ( $P < 0,01$ ). El menor diámetro lo presenta el tratamiento control con respecto al grupo B y C ( $P < 0,05$ ) (Cuadro 2).

En los animales de 26 días de edad hubo diferencias significativas entre el tratamiento B con respecto al A, D y control ( $P < 0,01$ ) al igual que B comparado con C ( $P < 0,05$ ).

Cualitativamente, se observó que los núcleos de las células de Leydig mantuvieron similar proporcionalidad en ratas tratadas durante 11, 21 y 31 días, por lo que se observó

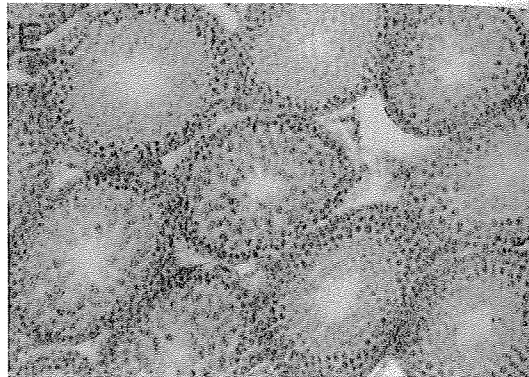
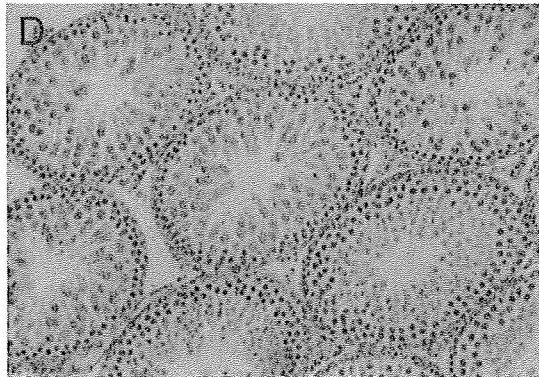
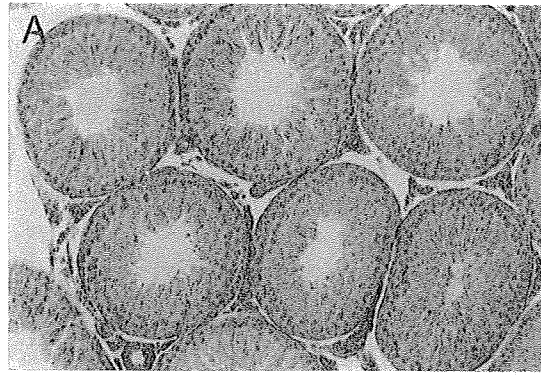


FIGURA 2

VISTA PANORÁMICA DE SECCIONES TESTICULARES DE ANIMALES TRATADOS Y CONTROL SACRIFICADOS A LOS 36 DÍAS DE EDAD, QUE MUESTRAN EL CRECIMIENTO DEL TÚBULO SEMINÍFERO ( $\times 50$ ) EN LOS TRATAMIENTOS A, D Y E, RESPECTIVAMENTE.

*Topographical view of testis sections of treated and control animals sacrificed at 36 days that show the seminiferous tubules growth in A, D and E treatment respectively ( $\times 50$ ).*

una pérdida de la forma habitual del núcleo según transcurrían los días tornándose más circulares. En relación a la cantidad y tamaño de las granulaciones observadas al interior del núcleo de las células de Leydig, se observó aumento de ellas según la edad del animal y el tratamiento aplicado, ya que en el grupo D el tamaño de dichas granulaciones fue mayor en el grupo control y el resto de los tratamientos (Fig. 4).

#### Evolución de la línea espermatogénica

El estado germinal más avanzado dentro de la línea espermatogénica en las ratas tratadas y controles en animales que se sacrificaron a los 16 días de edad fue el de espermátida redonda, presentándose además otros estados celulares

como el de espermatoцитos II y espermatoцитos I meióticos.

En el tratamiento A se observaron espermatoцитos II. En cambio en el tratamiento C, hubo mayor porcentaje de espermátidas redondas, seguido por el tratamiento B y luego el D al compararse con el control. En ratas de 26 días de edad, el estado germinal más avanzado fue el de espermátida alargada, espermatoцитo II y espermatoцитo I meiótico (Fig. 5). No obstante, el tratamiento A se mantuvo como el más involucionado dentro del desarrollo espermatogénico. Así entonces, los tratamientos más eficaces serían el C y D con respecto al B y al control.

En animales de 36 días de vida, se detectaron espermatoцитos en el desarrollo germinal

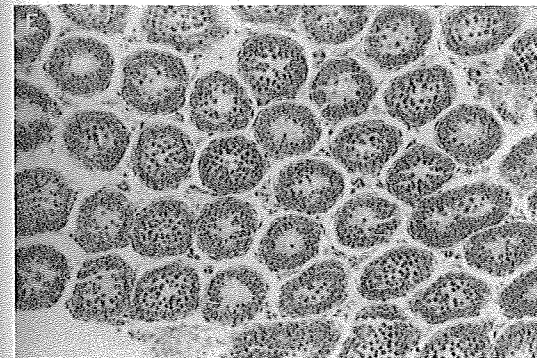
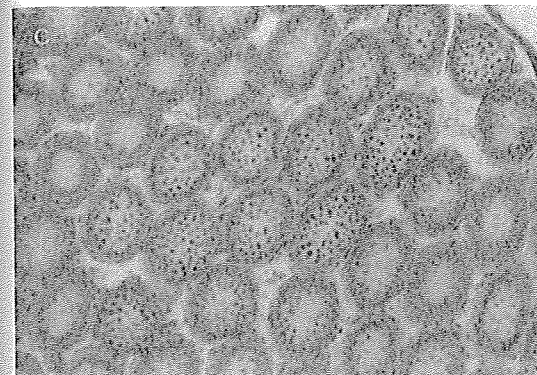


FIGURA 3

DETALLE DE SECCIONES TESTICULARES DE ANIMALES TRATADOS Y CONTROL SACRIFICADOS A LOS 16 DÍAS DE EDAD. NÓTESE EL MAYOR DIÁMETRO TUBULAR DEL TRATAMIENTO C CON RESPECTO AL E ( $\times 50$ ).

*Testis sections of treatment and control animals sacrificed at 16 days. It can be seen the larger seminiferous tubules diameter of treated animals (C) respect to control animals (E) ( $\times 50$ ).*

con aparición de otros estados como espermátidas alargadas y espermátidas redondas (Fig. 6). Los tratamientos A y C exhiben igual porcentaje de espermios que el grupo control.

Al analizar la evolución germinal, se observó que las ratas sometidas al tratamiento D presentaron mayor porcentaje de espermios (Fig. 7), los cuales se encontraban formando parte de manojos alojados en el lumen tubular, a diferencia de los tratamientos B, C y control donde éstos se ubicaban desorganizadamente en el contorno del lumen. En contraste, los espermios del tratamiento A se dispusieron en

el borde del epitelio germinal y a diferencia de todos los otros tratamientos se aprecian núcleos picnóticos en el interior de algunos túbulos seminíferos a los 36 días de edad.

#### DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio en relación a la aplicación intermitente de LHRH con diferentes frecuencias, dosis y medios de solución, sugieren que la administración de 500 ng de LHRH (Grupo D) en gel salino cada ocho horas, por períodos de 11, 21 y 31 días de tratamiento (Cuadro 2 y Figura 7), fue el medio más efectivo para generar un aumento en la actividad testicular. Por el contrario, la administración de nueve pulsos diarios de 40 ng de LHRH en solución salina (Grupo A), por iguales períodos de tratamiento, fueron las menos eficaces en estimular precozmente la pubertad.

El estado más avanzado de la línea germinal en las ratas de 16 días de edad con el tratamiento D correspondió a la espermátida redonda. A los 36 días se observó la presencia de espermatoцитos dispuestos en el lumen tubular (Figura 7). Estos hechos sugieren que hubo una temprana actividad testicular como resultado de un inicio prematuro de la espermatogénesis y cierre de la barrera hematotesticular (Amann *et al.*, 1983; Ramaley, 1979). El cierre de la barrera hematotesticular normalmente comienza alrededor de los veinte días de edad en la rata macho (Ramaley, 1979) y coincide con la formación inicial del lumen tubular (Ramaley, 1979). Dichos fenómenos, que en el presente estudio se registraron a los 16 días de edad, evidencian el inicio precoz de la espermatogénesis (Cuadro 2 y Figura 3).

Para provocar el inicio de la actividad testicular en mamíferos, se requiere que se active la secreción de LHRH desde el hipotálamo. La liberación de LHRH desde el hipotálamo aumenta la concentración de sus receptores en la adenohipófisis (Dalkin *et al.*, 1981) incrementándose la síntesis (Papavasiliou *et al.*, 1986) y la liberación de FSH y LH desde los gonadotropos (Bhasin *et al.*, 1986; Wildt *et al.*, 1981).

La administración de LHRH diluida en gel (tratamiento D) simuló lo que habría ocurrido

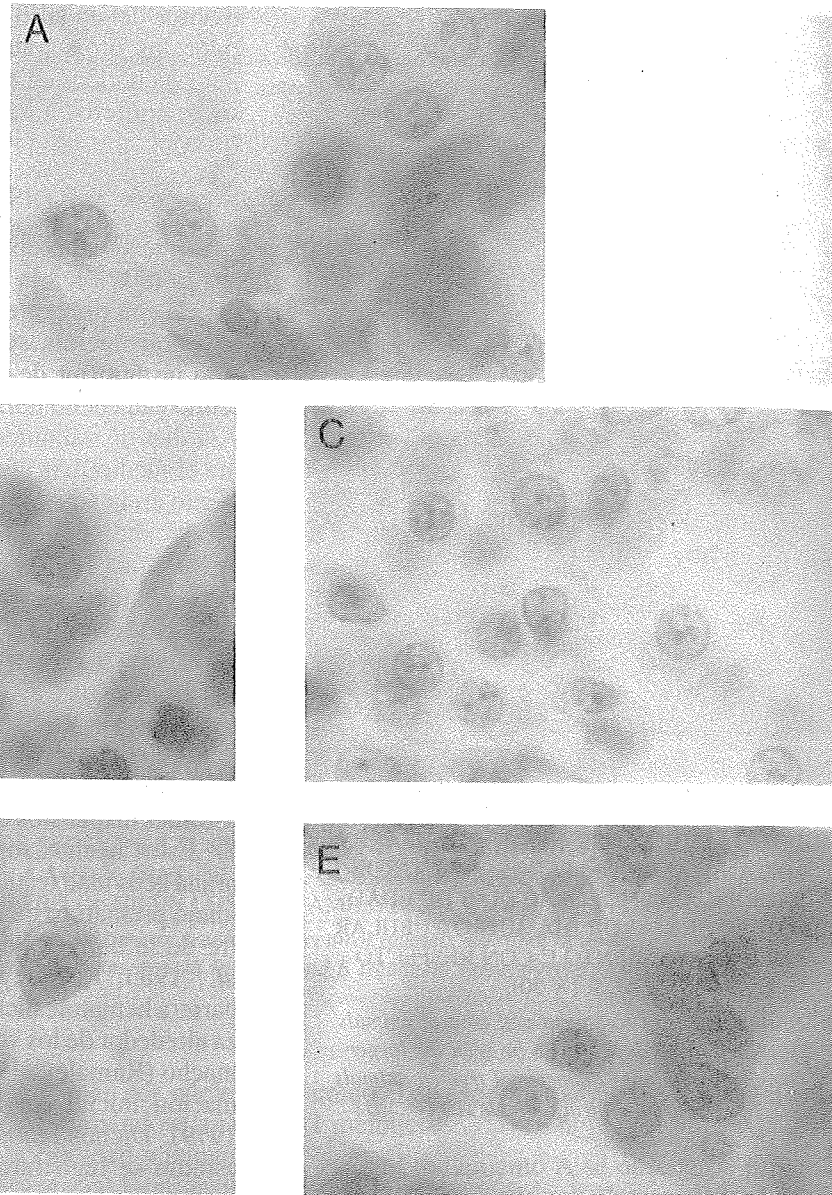


FIGURA 4

DETALLE DEL NÚCLEO DE LAS CÉLULAS DE LEYDIG EN RELACIÓN A LA FORMA Y CANTIDAD DE GRANULACIONES DE ANIMALES TRATADOS (GRUPOS A, B, C Y D) Y CONTROL (GRUPO E) SACRIFICADOS A LOS 36 DÍAS DE EDAD ( $\times 500$ ).

*Detail of Leydig cell nucleus in relation to the shape and granule abundance in treated (A, B, C and D) and control animals (E) sacrificed at 36 days ( $\times 500$ ).*

en forma endógena si se hubiese activado la secreción de LHRH, es decir, generó un aumento en el número de sus receptores, al pasar en forma constante al torrente circulatorio, o

bien, la LHRH exógena estimuló la hipófisis en forma permanente, sin generar una disminución en la concentración de sus receptores (down-regulation), situación que sí podría ha-

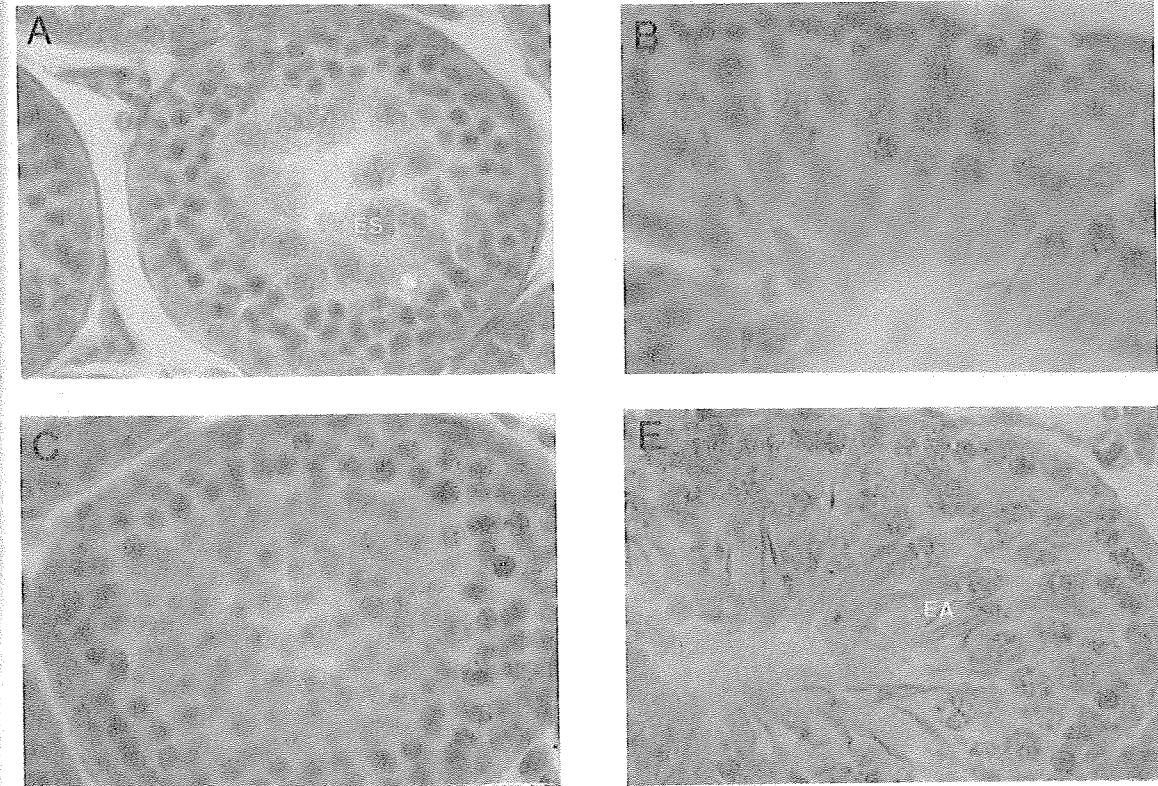


FIGURA 5

DETALLE DE LA EVOLUCIÓN DE LA LÍNEA ESPERMATOGÉNICA EN ANIMALES SACRIFICADOS A LOS 26 DÍAS DE EDAD TRATADOS (GRUPOS A, B Y C) Y CONTROL (GRUPO E) ( $\times 200$ ). EA, ESPERMÁTIDE ALARGADA; ES, ESPERMATOCITOS II.

*Detail of the sperm cell line in treatment (A, B and C) and control (E) animals sacrificed at 26 days. ( $\times 200$ ). EA, elongated spermatids; ES, secondary spermatocytes.*

ber ocurrido con las frecuencias más altas. La estimulación constante habría mantenido los niveles plasmáticos de LH por todo el tratamiento en valores superiores a los controles. A su vez, la LH liberada es captada en el compartimiento intersticial de los testículos por receptores específicos ubicados en las células de Leydig (Tsai-Morris *et al.*, 1985; Waites *et al.*, 1985), donde se incrementa la síntesis de testosterona. Este último esteroide tendría un importante rol en la iniciación de la espermatogénesis y posterior mantenimiento de ésta, específicamente en la etapa de división meiótica de los espermatozoides (Chemes *et al.*, 1984).

En contraste a la actividad estimuladora del tratamiento D, hubo una menor estimulación

con el tratamiento A. La administración, con una frecuencia alta de nueve pulsos diarios de LHRH en suero salino, habría provocado un fenómeno de refractoriedad (Sundaran *et al.*, 1984). Lo anterior se afirma con los datos obtenidos de la evolución de la línea espermatogénica de animales de 26 y 36 días de edad, ya que en ambas edades se pudo identificar igual número de espermatozoides II como el estado celular más avanzado al interior del túbulo, lo que indicaría una probable estabilidad, producto de un bloqueo de la espermatogénesis. El menor desarrollo de la línea germinal se debería a que los pulsos exógenos de LHRH habrían aumentado la síntesis y liberación de gonadotropinas y, por ende, la producción de testoste-

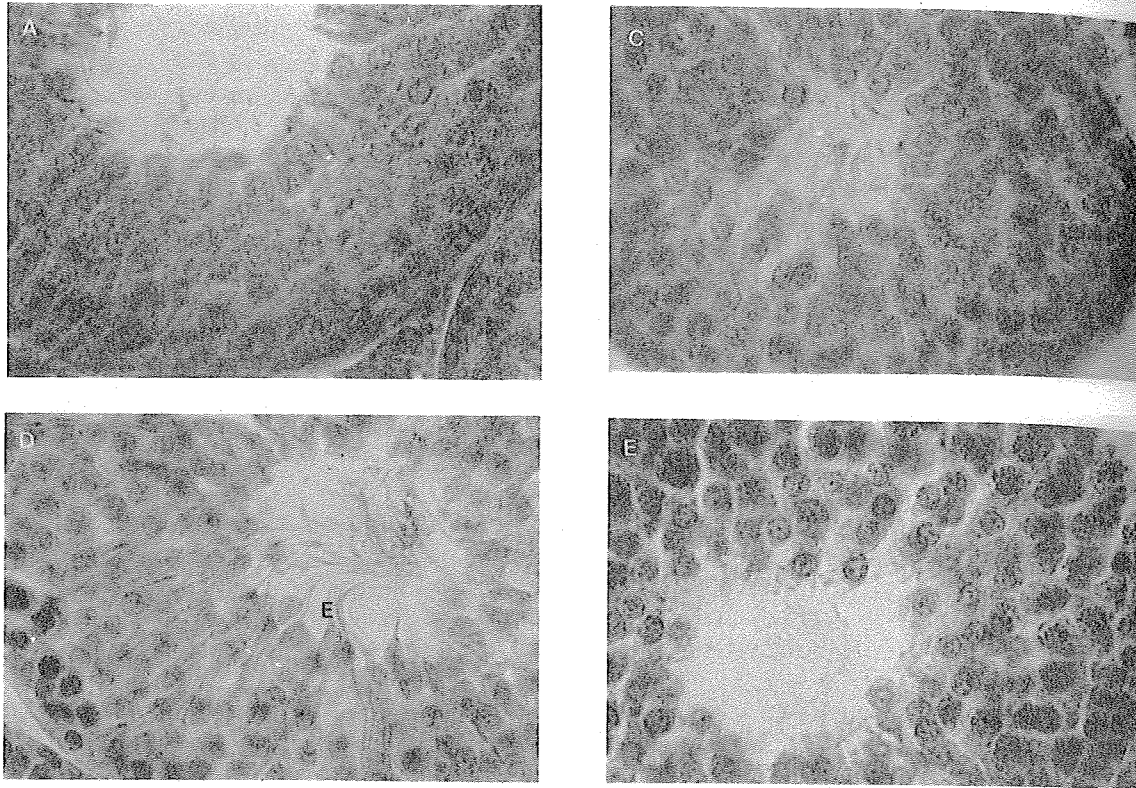


FIGURA 6

DETALLE DE LA EVOLUCIÓN DE LA LÍNEA ESPERMATOGÉNICA EN ANIMALES SACRIFICADOS A LOS 36 DÍAS DE EDAD ( $\times 200$ ) TRATADOS (GRUPOS A, C Y D) Y CONTROL (GRUPO E). E, ESPERMATOZOIDES.

*Detail of the sperm cell line in treated (A, C and D) and control (E) animals sacrificed at 36 days ( $\times 200$ ). E, sperms.*

rona desde las células de Leydig fetales, estimulando el inicio prematuro de la espermatogénesis. El bloqueo repentino de la actividad tubular sería producto de una disminución del número de receptores expresado en el momento de transición de las células de Leydig fetales a adultas, lo que ocurre durante el desarrollo prepuberal (Huhtaniemi *et al.*, 1982). Esta situación se traduciría en una disminución de secreción de gonadotropinas y por lo tanto, en una reducción de la producción de andrógenos testiculares. Este período inicial de estimulación y progresivo "down-regulation" de la secreción de LH hipofisario ha sido también reportado en estudios realizados en ratas machos con un agonista de LHRH (Bhasin *et al.*, 1986).

De acuerdo a lo mencionado por Huhtaniemi (1982), se puede sugerir que posterior al "down-regulation" de receptores de LHRH, y consecuentemente a la disminución en la concentración plasmática de LH, habría disminuido la testosterona circulante. Como resultado de esta disminución, se posibilitaría la desactivación del "down-regulation". La desactivación y el retorno de la actividad testicular habría demorado presumiblemente entre cinco a siete días (tiempo requerido para recuperar los receptores) (Huhtaniemi *et al.*, 1982).

Otros antecedentes que podrían ratificar la menor estimulación provocada por el tratamiento A, con respecto al D, son altura epitelial y peso testicular (Cuadro 2), donde se observó un menor incremento de estos paráme-

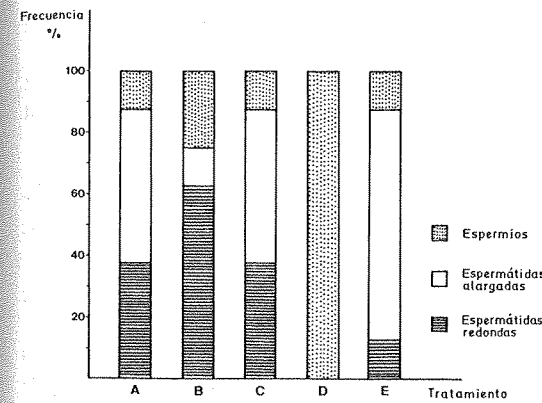


FIGURA 7  
FRECUENCIA (%) DE LOS ESTADOS CELULARES DE LA LÍNEA ESPERMATOGÉNICA DE ANIMALES TRATADOS Y CONTROLES DE 36 DÍAS DE EDAD.

*Frequency (%) of the different cell types of spermatogenic line of experimental and control animals at 36 days old.*

tros. Cabe también considerar la ocurrencia de un posible efecto retardador producto del estrés generado por una frecuencia de inyecciones tan alta, ya que los animales del grupo A tuvieron pesos menores que los de los grupos D y C a los 25 y 35 días de edad. Sin embargo, el grupo control que también recibió una frecuencia alta de inyecciones de suero salino, no presentó valores de peso corporal diferentes del grupo D.

Al determinar los pesos de las vesículas seminales y epidídimo como un indicador de la actividad de la testosterona, aparentemente no habría habido en dichos períodos en los grupos

tratados con LHRH, actividad que pudiera indicar la presencia de maduración sexual. Sin embargo, las modificaciones de la concentración de testosterona pueden no corresponder directamente con el peso de órganos como las vesículas seminales y epidídimo.

En resumen, los presentes resultados revelan la eficacia del tratamiento con 500 ng de LHRH en gel salino cada ocho horas para estimular el inicio precoz de la espermatogénesis.

## RESUMEN

Grupos de ratas machos inmaduros recibieron distintas dosis, frecuencias y duración de administración subcutánea de LHRH para determinar su efecto en el inicio de la actividad testicular. Finalizado el tratamiento, los animales fueron sacrificados y se les extrajeron los testículos para pesaje y fijación. Luego se prepararon las muestras por procedimientos histológicos de rutina para analizar el diámetro del túbulo seminífero, la altura y evolución del epitelio germinal y el diámetro del núcleo de las células de Leydig. Dichas variables y sus interrelaciones permitieron establecer el inicio de la espermatogénesis.

Se observó que los animales inyectados con tres pulsos diarios de 500 ng de LHRH en gel salino exhibieron una temprana actividad espermatogénica. Por el contrario, las ratas que recibieron 40 ng de LHRH en solución salina nueve veces al día, presentaron una disminuida actividad testicular, incluso inferior al grupo control, considerándose el tratamiento menos efectivo para desencadenar el inicio de la espermatogénesis.

## LITERATURA CITADA

- AMANN, R.P. and B.D. SCHANBACHER. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*. 57: 380-403.
- BHASIN, S. and R.S. SWERDLOFF. 1986. Mechanisms of gonadotropin-releasing hormone agonist action in the human male. *Endocrine Reviews*. 7: 106-114.
- CHEMES, H.E. and I. ALMIRON. 1984. Spermatogenic onset: the role of FSH on the control of spermatogonial multiplication and differentiation in immature rats. *Archivos de Biología y Medicina Experimental*. 17: 257-265.
- DALKIN, A.C.; G.A. BOURNE; D.R. PIEPER; S. REGIANI and J.C. MARSCHALL. 1981. Pituitary and gonadal gonadotropin releasing hormone receptors during sexual maturation in the rat. *Endocrinology*. 108: 1658-1564.
- HUHTANIEMI, I.T.; K. NOZU; D.W. WARREN; M.L. DUFAU and K.J. CATT. 1982. Acquisition of regulatory mechanisms for gonadotropin receptors and steroidogenesis in the maturing rat testis. *Endocrinology*. 111: 1711-1720.
- HUMASON, G.L. 1962. *Animal tissue techni-*

- ques. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 641 pp.
7. KORENBROT, C.C.; I.T. HUHTANIEMI and R.I. WEINER. 1977. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biology of Reproduction*. 17: 298-303.
  8. KRAGT, C.L. and J.F. MASKEN. 1972. Puberty-physiological mechanism of control. *Journal of Animal Science*. 34: 1-15.
  9. LINCOLN, G.A. 1979. Use of a pulsed infusion of luteinizing hormone releasing hormone to mimic seasonally induced endocrine changes in the ram. *Journal of Endocrinology*. 83: 251-260.
  10. MONGKONPUNYA, K.; H.D. HAFS; E.M. CONVEY and H.A. TUCKER. 1975. Serum LH and testosterone and sperm numbers in pubertal bulls chronically treated with gonadotropin releasing-hormone. *Journal of Animal Science*. 41: 160-165.
  11. PAPAVALIOU, S.S.; S. ZMEILI; S. KHOURY, T.D. LANDEFELD, W.W. CHIN and J.C. MARSHALL. 1986. Gonadotropin-releasing hormone differentially regulates expression of the genes for luteinizing hormone  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in male rats. *Medical Sciences*. 83: 4026-4029.
  12. RAMALEY, J. 1979. Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. *Biology of Reproduction*. 20: 1-31.
  13. SCHANBACHER, B.D.; M.J. D'OCCHIO and J.E. KINDER. 1982. Initiation of and testicular growth in oestradiol-17 $\beta$  - implanted bull calves with pulsatile infusion of luteinizing hormone releasing hormone. *Journal of Endocrinology*. 93: 183-192.
  14. SCHANBACHER, B.D.; M.J. D'OCCHIO and T.W. GETTYS. 1983. Pulsatile luteinizing hormone secretion in the castrate male bovine: effects of testosterone or estradiol replacement therapy. *Journal of Animal Science*. 56: 132-138.
  15. SETCHELL, B.P. 1978. The mammalian testis. Chapter 7. Spermatogenesis. Cornell University Press. Ithaca. N.Y.
  16. SUNDARAN, K.; R.B. THAU; M. GOLDSTEIN; D.M. PHILLIPS; J. RIVIER, W. VALE and C.W. BARDIN. 1984. Effect of an LHRH agonist on pituitary and testicular function in rhesus monkeys. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72: 365-371.
  17. TSAI-MORRIS, C.; D.R. AQUILANO and M.L. DUFAU. 1985. Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. *Endocrinology*. 116: 38-46.
  18. WAITES, G.M.; A.C. SPEIGHT and N. JENKINS. 1985. The functional maturation of the Sertoli cell and Leydig cell in the mammalian testis. *Journal of Reproduction and Fertility*. 75: 317-326.
  19. WILDT, L.; G. MARSHALL and E. KNOBIL. 1980. Experimental induction of puberty in the infantile female rhesus monkey. *Science*. 207: 1373.
  20. WILDT, L.; A. HAUSLER; S.G. MARSHALL; J.S. HUTCHISON; T.M. PLANT; P.E. BELTCHETZ and E. KNOBIL. 1981. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 109: 376-385.

## SUPLEMENTACIÓN DE COLINA EN LA PRODUCCIÓN DE HÍGADO GRASO DE GANSO

### PRODUCCIÓN DE HÍGADO GRASO DE GANSO. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON COLINA ANTES DEL CEBADO

#### GEESE FATTY LIVER PRODUCTION. THE EFFECT OF SUPPLEMENTING DIETARY CHOLINE BEFORE FORCE-FEEDING

MANUEL CAMIRUAGA L. Y JAVIER LECAROS

*Departamento de Zootecnia,*

*Facultad de Agronomía,*

*P. Universidad Católica de Chile*

#### SUMMARY

*The effect of supplementing dietary choline before force feeding on geese fatty liver weight was studied. The main objective of this treatment was to increase choline deficiency during force feeding in adult geese.*

*Choline was added at 1,5% of total diet in both maintenance and pre-force feeding periods. Landes type once year old geese were used.*

*Results obtained shown a clear effect of choline addition in the pre-force feeding on final liver weight. In addition, it was shown that adult geese clearly enhance choline deficiency symptoms during force feeding when choline is added in the pre-force feeding period.*

#### INTRODUCCIÓN

La producción de hígado graso de ganso para elaborar *paté de foie*, requiere de una técnica en la que están involucrados factores genéticos, nutricionales, sanitarios y de manejo.

En lo esencial esta técnica consiste en alimentar forzosamente a los animales, durante un corto período de tiempo (15-18 ds.), con una dieta muy rica en carbohidratos (fundamentalmente maíz).

En las aves, el hígado es el órgano central, tanto para la síntesis de grasa como para el intercambio y movilización de ellas. Las aves

son muy susceptibles al engrasamiento hepático debido a la falta de un sistema linfático, de tal forma que las grasas del alimento deben seguir la vía portal directamente al hígado, y también a la escasa capacidad del tejido adiposo de sintetizar grasas. De esta forma, la grasa sintetizada en el hígado se acumula en este órgano debido a la incapacidad de evacuar hacia el tejido adiposo.

La colina es un constituyente activo de las lecitinas, las cuales han demostrado ser muy efectivas en la prevención de la acumulación de grasa del hígado (Scott, Nasheim y Young, 1982). La colina *per se* también tiene esta función. Se postula que la degeneración de grasa