

ORIGINALES

Concentraciones plasmáticas de FSH y morfometría testicular bajo los efectos de un análogo del GnRH: la buserelina

H. Rodríguez, M. Guzmán y A. Galanti

Laboratorio de Histoembriología. Programa de Morfología. Instituto de Ciencias Biomédicas. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago de Chile. Chile.

RESUMEN

Objetivos: Analizar las concentraciones plasmáticas de FSH y la histología de los túbulos seminíferos tras la administración crónica y en supradosis de buserelina en ratones de la cepa A/Snell.

Material y método: Se distribuyó a 40 ratones macho de la cepa A/Snell de 2,5 meses de edad (condiciones de bioterio estándar) en 7 grupos experimentales y 1 de control (suero salino). Los ratones de los grupos experimentales recibieron, cada uno, 500 ng de buserelina cada 24 h por vía intraperitoneal. Los ratones fueron sacrificados los días 1, 2, 3, 5, 6, 8 y 11, previa obtención de sangre (punción cardíaca) para medir la concentración de FSH (radioinmunoanálisis), y se extrajeron los testículos y se fijaron en Bouin alcohólico. A continuación, a través de la histología sistemática, se obtuvieron secciones de 5 μ m de espesor para la tinción de hematoxilina-PAS, en las que se evaluaron el diámetro de los túbulos (DTS) y la altura del epitelio germinal (AEG).

Resultados: La buserelina indujo un descenso brusco de la FSH plasmática (al 70% con respecto al control, 24 h postadministración), que se mantuvo baja y con valores mínimos en el día 5. En la morfometría testicular se observó un leve aumento en la altura del epitelio germinal (del 7 al 12% respecto al control; $p > 0,05$). De modo similar, el DTS tuvo una variación entre el -8 y el +8%. Al analizar la AEG/DTS, en todos los grupos experimentales resultó ser mayor que en el grupo control, en un rango entre el 1 y el 12%.

Discusión: La integridad funcional del eje hipotálamo-hipófisis-testículo puede ser regulada farmacológicamente, cuyos efectos generan cambios en la organización del epitelio seminífero con un aumento de la altura de las células de Sertoli relacionadas con las concentraciones de FSH y cambios en la espermatogénesis.

Palabras clave: FSH. Morfometría testicular. Buserelina. GnRH. Ratón.

Correspondencia: Prof. Dr. H. Rodríguez.
Programa de Morfología. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
Avda. Independencia, 1027. Casilla 70079, Santiago-7. Santiago de Chile. Chile.
Correo electrónico: hrodrigu@med.uchile.cl

ABSTRACT

Plasma levels of follicle-stimulating hormone and seminiferous tubule morphometry under the effect of the gonadotrophin-releasing hormone analogue buserelin

Aim: To analyze plasma follicle-stimulating hormone (FSH) levels and seminiferous tubule histology in A/Snell mice under chronic high doses of buserelin.

Material and method: Forty male A/Snell mice, aged 2.5 months, were housed with pellet and water ad libitum (12/12 dark/light). The animals were distributed in seven experimental groups and one control group (physiological solution). In the experimental groups each mouse received 500 ng of buserelin (125 μ l of Conceptal® every 24 hours intraperitoneally). Blood was obtained by cardiac puncture to assess FSH by radioimmunoassay and the mice were sacrificed 1, 2, 3, 5, 6, 8 and 11 days after injection. The testes were extracted and processed for routine histological technique (hematoxylin-eosin) to evaluate tubular diameter (STD, μ m) and height of the germinal epithelium (HGE, μ m). The results are expressed as mean \pm SD.

Results: Buserelin induced a rapid decrease in blood FSH (70% compared with controls 24 hours after injection). Thereafter, blood values remained low and were lowest on day 5. During buserelin administration HGE increased (7-12 % compared with controls; $p > 0.05$). STD also increased (from -8 to +8%). HGE/STD was 1-12% higher in all experimental groups than in the control group.

Conclusion: The hypothalamus-pituitary-testicular axis can be modified by drugs. The effects of these drugs can produce changes in the seminiferous epithelium, with enlargement of the Sertoli compartment related to FSH levels, and there seems to be a reversible arrest of late stages of spermatogenesis.

Key words: FSH. Testicular morphometry. Buserelin. GnRH. Mouse.

INTRODUCCIÓN

En los mamíferos, la función testicular está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. El factor hipotalámico liberador de gonadotrofinas (GnRH) induce la liberación de las gonadotrofinas hipofisiarias (LH, FSH)¹. En la regulación de la función hormonal, la LH estimula la síntesis y liberación de testosterona en las células de Leydig, y la FSH promueve la síntesis y liberación de inhibina por las células de Sertoli²⁻⁴. La liberación de las gonadotrofinas es regulada en sentido inhibitorio por la inhibina y la testosterona en la hipófisis⁵. De manera paralela, la liberación hipotalámica de GnRH está regulada negativamente por las concentraciones plasmáticas de testosterona.

En el testículo, la FSH promueve el inicio de la espermatoGENIA y la testosterona participaría en su manutención⁶.

En el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, tanto las hormonas tipo glucoproteínas (GnRH, FSH) como las esteroideas actúan por mecanismos vía receptores específicos^{7,8}.

Entre los mecanismos de regulación por el receptor, la desensibilización consiste en la ausencia de respuesta celular ante la presencia ininterrumpida del ligando que actúa sobre el receptor por internalización, destrucción o cambios morfológicos de éste, o bien por alteraciones posreceptor. Paralelamente, los efectos de la desensibilización celular por la presencia del ligando son una propiedad de los mecanismos vía receptor que se pueden manejar farmacológicamente con fines terapéuticos o científicos⁹⁻¹².

Específicamente, el receptor del GnRH está unido a la proteína G y su activación induce la entrada de calcio en la célula hipofisiaria con la activación de la proteíncinasa C y la calmodulina, lo que permite la descarga a la circulación de LH y FSH preformadas^{11,13}.

En el aspecto farmacológico, la buserelina es un nonapéptido análogo del GnRH con la presencia de 2 sustituciones: D-serina en posición 6 y prolina en posición 10, además de la ausencia del aminoácido 9. Por tanto, la buserelina permitiría inducir la liberación de gonadotrofinas hipofisiarias a través de los receptores específicos según la dosis y la duración de su efecto. Experimentalmente, sería posible realizar un control exógeno de las concentraciones plasmáticas de FSH y, de manera indirecta, controlar la actividad gonadal^{6,8,13-15}.

Por último, concentraciones plasmáticas crecientes de GnRH o de sus análogos sintéticos, como la buserelina, desencadenarían una respuesta del tipo desensibilización hipofisiaria, cuya cuantificación estaría representada por una concentración baja de FSH sanguínea.

En el presente trabajo se analizan las concentraciones plasmáticas de FSH y la histología de los túbulos seminíferos en relación con la administración crónica y en supradosis de buserelina para ello se utiliza como modelo biológico ratones de la cepa A/Snell.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 40 ratones macho de la cepa A/Snell, de 2,5-3 meses de edad, mantenidos con estándares de bioterio. Los animales fueron distribuidos en 7 grupos experimentales y 1 grupo control ($n = 5$ en cada grupo). En los grupos experimentales, cada ratón recibió 500 ng de buserelina (125 μ l de Conceptal[®]) cada 24 h por inyección intraperitoneal, a las 12:30 h de cada día. El grupo control recibió inyecciones de suero salino.

Durante el experimento, los animales fueron sacrificados de acuerdo con las normas de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Antes de proceder al sacrificio, y por punción cardíaca, se obtuvo sangre para recuperar el suero: se midió la concentración de FSH mediante radioinmunoanálisis (RIA), con suero anti-FSHh preparado en conejo (primer anticuerpo) y suero anticonejo preparado en cabra (segundo anticuerpo). A continuación se extrajeron los testículos y se fijaron en Bouin alcohólico durante 8 h. Se utilizaron las técnicas histológicas sistemáticas: impregnación en parafina de punto de fusión entre 56 y 58 °C y obtención de cortes de 5 μ m de espesor. Con tinción de hematoxilina-PAS se realizó el examen histológico, en el que se evaluaron el diámetro de los túbulos (DTS) y la altura del epitelio germinal (AEG).

Durante el período experimental de administración de buserelina, las muestras de sangre y las gónadas fueron obtenidas los días 1, 2, 3, 5, 6, 8 y 11.

Los resultados obtenidos de las concentraciones plasmáticas de FSH, así como los diámetros y las alturas de los epitelios, fueron analizados con estadísticos de promedios, desviación estándar, razones y pruebas de significación mediante el test de la t de Student para muestras pareadas y análisis de varianza múltiple, siempre considerando como significativos los valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Durante el experimento, los animales no mostraron cambios conductuales ni en los hábitos de alimentación ni de bebida, ni cambios significativos en los pesos corporales ni de las gónadas.

Concentración plasmática de FSH

La administración de buserelina indujo un descenso brusco de las concentraciones sanguíneas de FSH (24 h postadministración), con valores porcentuales cercanos al 70% con respecto al grupo control. Posteriormente, la FSH alcanzó valores mínimos en el día 5. En general, la administración crónica de buserelina indujo un rango de inhibición de la FSH sanguínea del 70-87%. Esta información se presenta en la tabla 1.

Morfometría testicular

La integridad estructural del testículo, según el diámetro de los túbulos seminíferos (DTS) y la altura del epitelio germinal (AEG, epitelio germinal citogénico), aseguraría la calidad de la espermatogénesis. La FSH actúa directamente sobre la fisiología del testículo y su integridad estructural. Sin embargo, y de acuerdo con los resultados expuestos en la tabla 1, se muestra que, en los adultos, las concentraciones plasmáticas de FSH necesarias para la manutención de la arquitectura del testículo podrían estar por debajo del 30% sanguíneo. Específicamente, durante los períodos de administración de buserelina se observó un leve aumento de la altura del epitelio germinal, en un rango entre el 7 y el 12%, respecto del control. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), con excepción del día 8, en el que la AEG fue un 2% más baja que en el grupo control. Paralelamente y de modo similar, el DTS tuvo un rango de variación entre el -8 y el +8% respecto al grupo control.

La razón AEG/DTS en todos los grupos experimentales resultó ser mayor que en el grupo control, con un rango entre el 1 y el 12%. Se destaca una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) en los días 4 y 5 tras la administración de buserelina.

DISCUSIÓN

La administración prolongada y en dosis altas de agonistas del GnRH genera una supresión de la función testicular en el varón y en los animales de laboratorio^{7,15}; por ello, se utiliza para inducir una castración médica-bioquímica reversible^{8,16}, con una histología testicular con escasa fibrosis peritubular, espermatogénesis intacta hasta citos II y espermátidas redondas o

simplemente espermatogonias¹⁷. En el varón, los análogos del GnRH se usan para disminuir las concentraciones plasmáticas de FSH y LH en la pubertad precoz¹⁸ y como preterapia del cáncer prostático¹⁹.

Adicionalmente, en potros, el GnRH aumenta las concentraciones iniciales de LH e induce una mejoría de la libido, pero no incrementa la testosterona circulante²⁰.

En el presente trabajo, la administración crónica de buserelina indujo una deprivación drástica y rápida de FSH que se mantuvo mientras ésta estuvo presente. Es probable que esta deprivación se corresponda con una desensibilización de las células gonadotropas por la ocupación de los receptores de GnRH por el análogo sintético, buserelina. Más aún, se conoce que la unión del análogo sintético al receptor de GnRH es una unión prolongada, en comparación con la duración de la unión con el péptido natural²¹.

La inhibición de la espermatogénesis por los análogos del GnRH se debe a las bajas concentraciones sanguíneas de FSH y LH, cuya reversibilidad dependerá de la capacidad de la hipófisis para reiniciar la síntesis de gonadotrofinas¹⁷.

La deprivación de FSH induce cambios histológicos en la organización de los túbulos seminíferos y en las poblaciones celulares de la espermatogénesis. Estos cambios se presentan con un aumento de la razón AEG/DTS, principalmente sobre la base de una disminución del DTS y un aumento de la altura de las células de Sertoli.

Según Moudgal et al²², en monos, las bajas concentraciones circulantes de FSH alteran algunos marcadores bioquímicos de la función testicular, como la actividad de la hialuronidasa y la incorporación de timidina tritiada en la síntesis de ADN testicular. Adicionalmente, una deprivación prolongada de FSH genera una oligozoospermia aguda e infertilidad. Del mismo modo, Aravindan et al²¹ y Wickings et al²³ describen una pérdida de la asociación normal de las células germinales con una drástica disminución del DTS diferente de lo que ocurre durante la senilidad del epitelio seminífero humano con la presencia de enfermedades epiteliales²⁴. En la tabla 2 se muestran resultados similares y se describe una razón AEG/DTS más alta en presencia de buserelina; esto es debido a una disminución del DTS, pero también a un leve aumento de la altura del epitelio seminífero compuesto principalmente por células de Sertoli extendidas hacia el lumen. Según Properzi et al⁶, el aspecto extendido de las células de Sertoli hacia la luz

TABLA 1. Concentración plasmática de FSH en ratones adultos con administración diaria de buserelina (500 ng)

Inyección días	Control	1	2	3	5	6	8	11
FSH (ng/100 µl)	5,7 ± 1,3	1,7 ± 1,1 70	1,54 ± 0,25 74	1,35 ± 0,21 75	0,76 ± 0,39 87	1,4 ± 0,2 75	1,49 ± 0,12 74	1,52 ± 0,39 74
Inhibición (%)								

TABLA 2. Altura del epitelio germinal (AEG) frente al diámetro de los túbulos seminíferos (DTS) en ratones con administración diaria de buserelina (500 ng)

Grupo	Control	1 día	2 días	3 días	5 días	6 días	8 días	11 días
AEG	0,57 ± 0,07	0,61 ± 0,8	0,62 ± 0,06	0,63 ± 0,06	0,61 ± 0,05	0,64 ± 0,17	0,56 ± 0,09	0,61 ± 0,1
Variación (%)		+7	+9	+10	+7	+12	-2	+7
DTS	1,73 ± 0,17	1,82 ± 0,13	1,84 ± 0,09	1,76 ± 0,15	1,65 ± 0,1	1,86 ± 0,41	1,59 ± 0,22	1,76 ± 0,14
Variación (%)		+5	+6	+2	-5	+8	-8	+2
AEG/DTS	0,33 ± 0,02	0,347 ± 0,03	0,336 ± 0,02	0,357 ± 0,02 ^a	0,371 ± 0,01 ^b	0,334 ± 0,03	0,349 ± 0,03	0,334 ± 0,03
Variación (%)		+5	+2	+8	+12	+1	+6	+1

^ap ≤ 0,05; ^bp ≤ 0,01.

de los túbulos seminíferos es característico de células inmaduras y simula una hipofisección farmacológica.

El descenso de las concentraciones plasmáticas de FSH en los animales tratados con buserelina (500 ng) se situó entre el 70 y el 80%, probablemente por la desensibilización de la hipófisis como respuesta a la presencia permanente del análogo del GnRH a través de la ocupación del mismo receptor. Estos hallazgos coinciden con los descritos en monos, en los que la administración crónica de buserelina indujo un descenso del 80% de la FSH circulante²¹. Paralelamente a la desensibilización de la hipófisis se describen alteraciones de la histología testicular, principalmente en las espermatidas redondas y elongadas, con total desorganización de los estados del ciclo de la espermatogénesis.

Por último, es posible concluir que la buserelina administrada durante períodos prolongados induce un drástico descenso de las concentraciones plasmáticas de FSH y, con ello, una detención fisiológica y reversible de la espermatogénesis en etapas tardías.

Bibliografía

- Zhang F, Pakarinen T, Zhu F, Poutanen M, Huhtaniemi I. Molecular characterization of postnatal development of testicular steroidogenesis in luteinizing hormone receptor knockout mice. *Endocrinology*. 2003;145:1453-63.
- Kitahara S, Kotsuji F, Keeping H, Oshima H, Troen P, Winters S. Interrelationship between the actions of testosterone and primate Sertoli cell inhibin in the control of gonadotropin secretion by cultured pituitary cells. *Endocrinology*. 1991;128:710-6.
- Anderson L, Hoyland J, Mason W, Eidne K. Characterization of the gonadotrophin-releasing hormone calcium response in single alpha T3-1 pituitary gonadotroph cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1992;86:167-75.
- Anderson R, Wallace E, Groome N, Bellis A, Wu F. Physiological relationships between inhibin B, follicle stimulating hormone secretion and spermatogenesis in normal men and response to gonadotrophin suppression by exogenous testosterone. *Hum Reprod*. 1997;12:746-51.
- Weinbauer G, Nieschlag E. Gonadotrophin control of testicular germ cell development. *Adv Exp Med Biol*. 1995;377:55-65.
- Properzi G, Francavilla S, Vicentini C, Cordeschi G, Galassi P, Paradiso G, et al. Testicular changes after treatment with a GnRH analog (Busereline) in association with cyproterone acetate in men with prostatic cancer. *Eur Urol*. 1989;16:426-32.
- Roth C, Leonhardt S, Seidel C, Luft H, Wuttke W, Jarry H. Comparative analysis of different puberty inhibiting mechanisms of two GnRH agonists and the GnRH antagonist cetrorelix using a female rat model. *Ped Res*. 2000;48:468-74.
- Souza S, Selmin F, Murty S, Qiu W, Thanoo B, De Luca P. Assessment of fertility in male rats after extended chemical castration with a GnRH antagonist. *AAPS Pharm Sci*. 2004;6:1-6.
- Vickery B, McRae G, Briones W, Worden A, Seidenberg R, Schanbacher B, et al. Effects of an LHRH agonist analog upon sexual function in male dogs. Suppression, reversibility, and effect of testosterone replacement. *J Androl*. 1984;5:28-42.
- Garnick M, Fair W. Combating prostate cancer. *Sci Am*. 1998; 279:74-83.
- McArdle C, Franklin J, Green L, Hislop J. Signalling, cycling and desensitization of gonadotrophin-releasing hormone receptors. *J Endocrinol*. 2002;173:1-11.
- Pucarelli I, Segni M, Ortore M, Arcadi E, Pasquino A. Effects of combined gonadotropin-releasing hormone agonist and growth hormone therapy on adult height in precocious puberty: a further contribution. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2003;16:1005-10.
- Limonta P, Montagnani M, Marelli M, Moretti R. LHRH analogues as anticancer agents: pituitary and extrapituitary sites of action. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001;10:709-20.
- Huhtaniemi I, Nikula H, Rannikko S. Treatment of prostatic cancer with a gonadotropin-releasing hormone agonist analog: acute and long term effects on endocrine functions of testis tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985;61:698-704.
- Behre H, Nashan D, Hubert W, Nieschlag E. Depot gonadotropin-releasing hormone agonist blunts the androgen induced suppression of spermatogenesis in a clinical trial of male contraception. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;74:84-90.
- Horvath J, Bajo A, Schally A, Kovacs M, Herbert F, Groot K. Effects of long-term treatment with the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist Decapeptyl and the LHRH antagonist Cetrorelix on the levels of pituitary LHRH receptors and their mRNA expression in rats. *PNAS*. 2002;99:15048-53.
- Johansen T, Ogreid P, Jellevold K, Blom P. Testicular histology after treatment with LH-RH analogue for carcinoma of the prostate. *Br J Urol*. 1990;65:376-8.
- Wide L, Albertsson-Wiklund K, Phillips D. More basic isoforms of serum gonadotropins during gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in pubertal children. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:216-21.
- Limonta P, Dondi D, Moretti R, Maggi R, Motta M. Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists on the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;75:207-12.
- Parlevliet J, Bevers M, Van de Broek J, Colenbrander B. Effect of GnRH and hCG administration on plasma LH and testosterone concentrations in normal stallions, aged stallions and stallions with lack of libido. *Vet Q*. 2001;23:84-7.
- Aravindan G, Gopalakrishnan K, Ravindranath N, Moudgal N. Effect of altering endogenous gonadotrophin concentrations on the kinetics of testicular germ cell turnover in the bonnet monkey (*Macaca radiata*). *J Endocrinol*. 1993;137:485-95.
- Moudgal N, Ravindranath N, Murthy G, Dighé R, Aravindan G, Martin F. Long term contraceptive efficacy of vaccine of ovine follicle stimulating hormone in male bonnet monkeys (*Macaca radiata*). *J Reprod Fertil*. 1992;96:91-102.
- Wickings E, Nieschlag E. Suppression of spermatogenesis over two years in rhesus monkey actively immunized with follicle stimulating hormone. *Fertil Steril*. 1980;34:269-74.
- Rodríguez H, Ríos A, Sarabia L, Araya JC. Inmunohistoquímica de filamentos intermedios, tipo vimentina y desmina, y enzima enolasa en túbulos seminíferos seniles humanos. *Rev Int Androl*. 2004;2:9-14.