



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

13
24

INDUCCION DE OLIGOSPERMIA REVERSIBLE CON
FURAZOLIDONA EN EL CONEJO
(A UNA DOSIS DE 50 mg/kg DE PESO)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A ;

JOSE MANUEL AUDELO VALONA

ASESOR:

M. en C. CRISTINA REVILLA MONSALVE

CIUDAD UNIVERSITARIA

1991

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	RESUMEN	
I	INTRODUCCION	
II	ANTECEDENTES HISTORICOS.....	1
II.1	NITROFURANOS.....	1
II.1.1	PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.....	2
II.1.2	METABOLISMO.....	2
II.1.3	APLICACIONES DE LOS NITROFURANOS.....	4
II.1.4	TOXICIDAD.....	5
II.1.5	MECANISMO DE ACCION.....	7
II.2	FURAZOLIDONA.....	8
II.2.1	PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.....	8
II.2.2	METABOLISMO.....	8
II.2.3	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	9
II.2.4	TOXICIDAD.....	10
III	HIPOTESIS.....	18
IV	OBJETIVOS.....	18
V	MATERIAL Y METODO.....	20
V.1	PRUEBA DE FERTILIDAD 1.....	20
V.2	LOTES EXPERIMENTAL Y TESTIGO.....	20
V.3	COLECTA DE SEMEN.....	21
V.4	ESPERMATOBIOSCOPIA.....	23
V.4.1	VOLUMEN.....	23
V.4.2	MOTILIDAD.....	23
V.4.3	DENSIDAD.....	23
V.4.4	MORTALIDAD.....	23
V.4.5	MALFORMACIONES.....	24
V.5	NIVELES HORMONALES.....	24

V.6	PRUEBA DE FERTILIDAD 2.....	24
V.7	SUSPENSION DEL MEDICAMENTO.....	25
V.8	ESTUDIO HISTOLOGICO 1.....	25
V.9	RECUPERACION.....	25
V.10	CONDUCTA SEXUAL.....	26
V.11	CONDICIONES DE LA DESCENDENCIA.....	26
V.12	ESTUDIO HISTOLOGICO II.....	26
V.13	PRUEBA ESTADISTICA.....	26
VI	RESULTADOS.....	28
VI.1	PRUEBA DE FERTILIDAD 1.....	28
VI.2	ESPERMATOBIOSCOPIA.....	28
VI.2.1	VOLUMEN.....	28
VI.2.2	MOTILIDAD.....	28
VI.2.3	DENSIDAD ESPERMATICA.....	33
VI.2.4	MORTALIDAD.....	33
VI.2.5	MALFORMACIONES.....	33
VI.3	NIVELES HORMONALES.....	43
VI.4	PRUEBA DE FERTILIDAD 2.....	50
VI.5	ESTUDIO HISTOLOGICO.....	50
VI.6	RECUPERACION.....	55
VI.7	CONDUCTA SEXUAL.....	55
VI.8	CONDICIONES DE LA DESCENDENCIA.....	55
VI.9	ESTUDIO HISTOLOGICO.....	55
VII	DISCUSION.....	58
VIII	CONCLUSIONES.....	65
IX	BIBLIOGRAFIA.....	67
	ANEXO 1.....	75
	ANEXO 2.....	77

RESUMEN

Los estudios sobre anticoncepción habían sido enfocados principalmente a la mujer, sin embargo en la actualidad se realizan investigaciones cuya objetivo es encontrar métodos anticonceptivos aplicables al hombre.

La espermatogénesis es uno de los sitios vulnerables a nivel del cual se puede incidir con esta finalidad y la furazolidona, un nitrofurano de amplio espectro, ha probado ser capaz de inducir una atrofia temporal en los túbulos seminifero de diferentes organismos.

Con el objeto de determinar la dosis a la cual la furazolidona es capaz de inducir sin provocar efectos colaterales, una oligospermia reversible en el conejo, se probó la dosis diaria de 50 mg/kg de peso corporal.

Los resultados revelaron que la oligospermia incompatible con la fertilidad se logró a los seis meses de tratamiento, encontrándose además disminución en la motilidad espermática así como un incremento en la mortalidad y en las malformaciones espermáticas con reducción del tamaño y peso testicular. Histológicamente se confirmó el bloqueo de la espermatogénesis a nivel de espermatocono primario y su posterior restablecimiento 3 meses después de suspendido el tratamiento. Los niveles de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona así como la conducta sexual de los conejos no mostraron ningún cambio a lo largo del experimento ni en la fase de recuperación. El número y estructura macroscópica de la descendencia tampoco fue afectada, solo en un conejo se detectó dano a nivel de las glándulas suprarrenales.

I INTRODUCCION

Hasta hace relativamente poco tiempo los estudios sobre anticoncepción y el uso de métodos anticonceptivos habian sido enfocados exclusivamente a la mujer. En la actualidad se ha acelerado la investigación sobre anticoncepción masculina pero los conocimientos que se tienen a la fecha sobre los procesos básicos de reproducción masculina son limitados si se compara con los que se tienen sobre la femenina.

Los estudios tendientes a encontrar métodos anticonceptivos aplicables al hombre han revelado que existen varios sitios vulnerables que pueden ser utilizados como son: regulación de los factores liberadores hipotalámicos y/o gonadotropinas, retroalimentación esteroidea negativa, la espermatogénesis, esteroidogénesis, maduración espermática en el epididimo, transporte de los espermatozoides por los vasos deferentes y las características bioquímicas del plasma seminal.

Sin embargo existen varios problemas prácticos que se deben tomar en cuenta como son: la dificultad para separar las principales funciones testiculares, es decir, separar la espermátogénesis y la producción de andrógenos, el largo periodo entre el inicio del tratamiento hasta lograr la ausencia de espermatozoides en el eyaculado, la reversibilidad y el restablecimiento de la fertilidad, la posibilidad de que se produzcan inicialmente espermatozoides anormales con

la consecuente formación de descendientes con defectos y la falta de motivación del hombre para utilizar anticonceptivos.

Con base en los estudios realizados se han elaborado 8 propuestas para trabajar sobre la anticoncepción masculina, que son: la inhibición del desarrollo de los espermatozoides testiculares, la inhibición preferencial de las células de Sertoli, la inhibición de la esteroidogénesis, la inhibición posttesticular de la maduración de los espermatozoides, la inhibición de enzimas espermáticas, la alteración de la composición del plasma seminal y la anticoncepción inmunológica.

Una de las propuestas más aceptada ha sido la de la inhibición del desarrollo de los espermatozoides testiculares y sobre ésta se iniciaron los trabajos encaminados a encontrar un agente antiespermatogénico capaz de inhibir la espermatogénesis en etapas tardías, producir una infertilidad reversible, no afectar la libido y no producir efectos colaterales. Para ello se seleccionó a la Furazolidona, que es un agente antimicrobiano que pertenece al grupo de los nitrofuranos.

II ANTECEDENTES HISTORICOS

II.1 NITROFURANOS

Los nitrofuranos forman una amplia familia de antimicrobianos cuya estructura química determina una especificidad bien definida en el campo de la patología. Dentro de su amplio espectro, unos tienen selectividad por determinadas bacterias y otros tienen actividad contra protozoarios y algunos hongos.

El uso de los nitrofuranos como agentes terapéuticos en el tratamiento de las enfermedades del hombre y de los animales domésticos ha sido desarrollado en las pasadas cuatro décadas, sin embargo se ha tenido conocimiento de estos compuestos desde el siglo XVIII, cuando Scheele (1780), obtuvo ácido furóico por destilación seca del ácido mícico (60).

Los furanos son un tipo de sustancias orgánicas caracterizadas por un anillo heterocíclico de cuatro átomos de carbono y uno de oxígeno. El furfural descrito por Dobereiner en 1832, obtenido por deshidratación química de azúcares de cinco átomos de carbono, es el prototipo de varios derivados del furano en los que se ha encontrado actividades antimicrobianas.

Dodd y Stillman en 1944 reportaron la actividad de 42 derivados del furano, siendo una de sus características más relevantes la presencia de un grupo nitro en la posición -5 de la molécula, lo que le confiere una acción bacteriostática, efectiva contra organismos Gram positivos y Gram negativos. A altas

concentraciones los -5 nitrofuranos además de presentar una actividad bacteriostática también actúan como bactericidas(15).

II.1.1 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

En general los nitrofuranos son compuestos poco solubles; la nitrofurazona, nihidrazina, nifuraldizona, nitrofurantoina, furazolidona, furaltadona y nifuroxina son poco solubles en agua y aceite de cacahuete. La furazolidona, nihidrazina, furaltadona y nifuroxina son más solubles en cloroformo que en agua, la mayoría de los nitrofuranos son solubles en polietilenglicoles, dimetil-formamida y dimetil-sulfóxido (60).

Los nitrofuranos en solución diluida son fotosensitivos y deben ser protegidos de la luz del día y de la luz fluorescente. Las soluciones acuosas son estables a pH fisiológico, pero la mayoría son completamente inestables a pH de 10 o más (60).

II.1.2 METABOLISMO

Los estudios realizados en aves y mamíferos sobre el metabolismo de los nitrofuranos han demostrado que todos los tejidos del cuerpo excepto la sangre degradan rápida y completamente los nitrofuranos (11). El paso inicial en la degradación de los nitrofuranos es la reducción del grupo nitro, para lo cual se requiere de condiciones anaerobias, siendo los productos obtenidos, metabolitos que incorporan a su estructura química el anillo de furano, como lo demuestran los estudios realizados

por Tennenth y Ray (1972) en la orina de cerdos.

Las concentraciones plasmáticas después de la administración oral de diferentes nitrofuranos varia de acuerdo con el nitrofurano y con la especie en que se determine. En las heces fecales de ratas sometidas al tratamiento oral de 10 mg/kg de peso de furazolidona se encontró solo un 3% de la furazolidona, mientras que con la administración de 20 mg/kg de peso de nitrofurazona se detectaron 0.5% del fármaco en las heces y con 92 mg/kg de peso de furaltadona no se encontró residuo alguno en las heces (60).

Los órganos involucrados en el metabolismo de los nitrofuranos como son el hígado, corazón y testículo manifiestan una serie de cambios morfológicos y metabólicos muy serios. En el hígado se ha reportado una congestión severa, en el testículo cambios degenerativos en el epitelio germinal y detención de la espermatogénesis, en el corazón, cardiomiopatías y en las glándulas adrenales, atrofia de la corteza adrenal (30-33).

Se ha estudiado también el metabolismo de los nitrofuranos en organismos procariontes, encontrándose que éstos son degradados en condiciones anóxicas y que aumentan su toxicidad en condiciones hipóxicas, aunque algunos nitrofuranos como la turturilamina, formamida y furaltadona son recucidos a bajas concentraciones de oxígeno aumentando también su toxicidad y su poder mutagénico (44).

II.1.3 APLICACIONES DE LOS NITROFURANOS

Los derivados del furano son compuestos que poseen actividad antimicrobiana de amplio espectro. por lo que su empleo en el tratamiento de algunas infecciones se ha incrementado en la actualidad (56). Entre las bacterias más sensibles a la acción "in vitro" de los nitrofuranos se pueden citar: Aerobacter spp., Clostridium spp., Corinebacterium sp., Diplococcus sp., Escherichia coli, Klebsiella sp., Pasteurella spp., Proteus spp., Pseudomona spp., Salmonella spp., Shigella sp., Staphylococcus spp., Streptococcus spp., y Vibrio spp. (60).

El nitrofurfuril-metil-éter inhibe completamente el crecimiento de algunos hongos entre los cuales están: Microsporium audovini, Tricophyton mentagrophytes, Tricophyton schoenleini, Tricophyton rubrum, Microsporium gypseum, Coccicoides immitis, Candida albicans. La nifuroxina tiene acción en contra de Candida albicans, Microsporium canis, y Nocardia asteroides (60).

En cuanto a los nitrofuranos que actúan en contra de ciertos protozoarios se tiene a la nitrofurazona, furazolidona, nihidrazona y la nifuroxina, los cuales son efectivos en contra de: Eimeria spp., Hexamintia spp., Histomonas spp y Tricomona spp (60).

Los nitrofuranos son empleados como agentes terapéuticos para prevenir enfermedades en especies de importancia económica como aves, cerdos, caballos, conejos, etc. La furazolidona y otros nitrofuranos se han utilizado como aditivos para favorecer el crecimiento de aves y cerdo. Adicionando 20 y 50 g/ton de furazolidona en el alimento de cerdos se obtiene el óptimo de crecimiento de estos animales, obteniéndose resultados semejantes con la adición de 10 g/ton de nifidrazina en el caso de las aves (56). Recientemente en Japón se han utilizado los nitrofuranos como conservadores en alimentos destinados al consumo humano (43).

En estudios realizados "in vitro" se ha comprobado que los nitrofuranos son capaces de interferir el proceso glucolítico en E. coli, en la reacción donde se forma la acetil coenzima A, a partir del piruvato, ocurriendo esta inhibición en condiciones anaerobias y con concentraciones bajas del medicamento o en condiciones aerobias y con altas concentraciones del nitrofurano (35-49).

II.1.4 TOXICIDAD

La administración de dosis altas de nitrofuranos produce ciertos efectos colaterales, siendo los síntomas más prominentes una depresión en el crecimiento, ataxia, emesis, aspermia y cambios en las glándulas adrenales (60).

Los nitrofuranos tienen efectos tóxicos sobre la morfología y función testicular. éstos se conocen desde 1949 cuando se utilizó la nitrofurantoina en el tratamiento de tumores testiculares malignos en el hombre (36). En un estudio de trasplante de sarcoma de ratón S-13 se observó que la nitrofurazona inhibía las enzimas glucolíticas provocando una disminución de la actividad mitótica, llevando a las células tumorales a la muerte. Posteriormente se reconoció que esta acción es específica en el epitelio germinativo y que las células más sensibles eran los espermatoцитos secundarios, las espermátidas y los espermatozoides maduros (36).

Los nitrofuranos han demostrado que son capaces de inhibir la espermatogénesis en las ratas después de la administración de varios nitrofuranos (Furadoxil, Nitrofurazona), dicha inhibición ocurre en la fase de espermatoцитo primario observándose una recuperación de la función espermática después de suspender el tratamiento (Friedgood y Green, 1961; Prior y Ferguson, 1950 y Nelson y Fataneli, 1961). También se encontró que había una pérdida en el peso de los testículos y cambios degenerativos en las células del epitelio germinativo. En 1953, Nelson y Steinberger confirman que la inhibición ocurre en la fase de espermatoцитo primario (35). En 1957, Nelson y Bunge administraron en el humano una dosis oral diaria de nitrofurantoina de 10 mg/kg la cual produjo una depresión temporal de la espermatogénesis logrando el tejido testicular una recuperación

después de suspender el tratamiento (36).

11.1.5 MECANISMO DE ACCIÓN

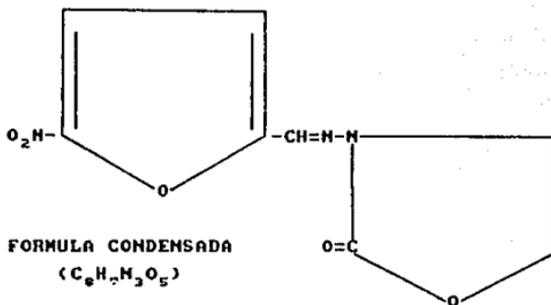
En cuanto a su mecanismo de acción antimicrobiana existen evidencias que indican que los nitrofuranos interfieren en un proceso metabólico esencial de las células bloqueando la acción enzimática en un paso anaerobio inicial en el metabolismo del piruvato por lo que interfiere en la utilización de los carbohidratos para propósitos de energía y síntesis (18).

Los estudios realizados para determinar el mecanismo de acción de los nitrofuranos sobre la dinámica de la espermatogénesis sugieren que se basa en la capacidad de interferir la formación de la acetil CoA a partir de piruvato en el proceso glucolítico, dejando por lo tanto a las células sin el aporte energético esencial para llevar a cabo sus funciones, en este caso completar el proceso meiótico (52).

II.2 FURAZOLIDONA

II.2.1 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

La furazolidona N-(5-nitro-2-furfurilidona)-3-amino-2-oxazolidona, es un nitrofurano que se presenta en forma de cristales de color amarillo y de sabor amargo, cuyo peso molecular es de 225.16, soluble en agua a pH 6, ligeramente soluble en polietilenglicoles y solventes orgánicos, y que se oscurece en presencia de luz intensa (Index Merck, 1968).



F U R A Z O L I D O N A (F O R M U L A E S T R U C T U R A L)

II.2.2 METABOLISMO

La furazolidona es poco absorbida en el tracto digestivo, mucosas y por la piel, sin embargo, cuando se suspende en aceite o en cualquier otro solvente orgánico aumenta su absorción. Los tejidos metabolizan la furazolidona a diferente velocidad, el hígado, riñon y testículo tienen un alto índice metabólico mientras que en el músculo, bazo y corazón el índice es menor y

en el cerebro es cero. El testículo es capaz de metabolizar altas concentraciones pero la exposición prolongada de la furazolidona produce lesiones en este órgano (16). La velocidad de degradación de la furazolidona es de 100 mg/kg de peso de tejido por hora. Por análisis cromatográfico se ha demostrado que después de la administración de una sola dosis de furazolidona, los metabolitos son eliminados por las vías urinarias doce horas después de su administración (Tenneth, 1963).

Tatsumi, et al (1984), describieron las posibles vías de degradación de la furazolidona "in vivo" e identificaron algunos metabolitos urinarios después de 4 días de haber administrado una dosis diaria de 100 mg/kg de peso en ratas machos. Por análisis cromatográfico se identificaron 4 metabolitos, los cuales representan solo el 25% de los metabolitos finales (55).

II.2.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La furazolidona tiene un amplio espectro antimicrobiano, se utiliza para el tratamiento y prevención de la tifoidea, hepatitis, gastroenteritis, hexamintiasis, coccidiasis, neumonia, salmonelosis y enfermedades respiratorias crónicas de aves y cerdos (60). En animales también se utiliza en el tratamiento de heridas y dermatosis bacterianas. En forma tópica, en el humano se utiliza para el tratamiento de quemaduras e inflamaciones así

como en el tratamiento de infecciones en la uretra del hombre y en los casos de tricomoniasis en la mujer (60).

II.2.4 TOXICIDAD

Omer, en 1978 reporta que la furazolidona en agua y administrada durante un mes a ratones a una dosis de 100-4000 mg/kg de peso corporal (LD50 2028 mg/kg), a palomas a una dosis de 500-4000 mg/kg de peso corporal (LD50 2375 mg/kg) y a conejos a una dosis de 500-3000 mg/kg de peso corporal (LD50 2125 mg/kg) tiene efectos nocivos como anorexia, diarrea, ataxia, depresión de crecimiento y disnea (40).

En las células cultivadas "in vitro", la furazolidona es capaz de inducir una mutación en el DNA de Escherichia coli y de Vibrio cholerae, siendo su efecto mayor mientras más alta es la concentración. Además es capaz de inhibir la síntesis de DNA y provocar el entrecruzamiento de los filamentos del DNA causando la destrucción de dichas células (43).

Las aves son con mucho el modelo animal más utilizado para evaluar los efectos de la furazolidona en los diferentes órganos. Francis y Schaffner (1955), estudiaron los efectos de la dosis profiláctica de la furazolidona en la producción de huevo, su viabilidad y la calidad de la cascara, no encontrando ninguna alteración, pero sí un incremento en la producción de huevo y la viabilidad (30).

Bellor, et al(1957), no encontraron ninguna alteración en los huevos obtenidos de gallinas sometidas a la dosis de 100, 150 y 500 mg/ton de furazolidona en el alimento durante cuatro semanas. Las pruebas espectrofotométricas no revelaron la presencia del medicamento en los huevos, lo que indica que la furazolidona aún a una concentración de 500 mg/ton. no se acumula en el huevo. Los tejidos no presentaron alteraciones ni rastro de la furazolidona en ellos. Estos resultados son similares a los que obtuvieron Dean y Stephenson(1958), en gallinas tratadas con 12.5 y 50 g/ton. de furazolidona en el alimento (14).

En algunos estudios se ha puesto de manifiesto la toxicidad de la furazolidona en el corazón de los patos, pavos y pollos, en los cuales se encontró que había una marcada dilatación ventricular y distensión del corazón, lo que provocó un incremento en el tamaño del mismo. En otro experimento Czarnecki y Jankus(1975) encontraron que el contenido de agua y glucógeno en el corazón de los pavos de 5 semanas de edad aumentaba con el tratamiento de 300 p.p.m. de furazolidona y que de igual forma la masa ventricular aumentaba con la administración de 700 p.p.m. de furazolidona (12).

Van Vleett, et al en 1982, encontraron que hay una incidencia de cardiomegalia y ascitis muy severa en los patos a los que se les administró una dosis de 750 mg/kg de peso de furazolidona durante 4 semanas y que las concentraciones mayores de 1000 p.p.m del medicamento provocan la muerte prematura de los animales

siendo estos resultados semejantes a los que obtuvo Czarnecki en 1972 en pavos (12-28).

En pollos la furazolidona es capaz de inducir un incremento de cortisona en el plasma, cuando se administra a concentraciones de 0.04% peso/peso durante una semana (2). En los experimentos de Ali, et al (1983), con pollos a los que se les administró la furazolidona a una concentración de 0.04% durante 10 días, no se encontraron cambios en el peso del corazón ni del páncreas, pero sí en el peso de las glándulas adrenales y de la tiroides, estos investigadores afirman que los incrementos observados son debidos a una hipertrofia en la corteza adrenal, ya que no hubo cambios en los niveles de adrenalina y noradrenalina, pero sí una reducción en la concentración del colesterol y la glucosa en las glándulas adrenales. Por otra parte, en el plasma las concentraciones de ácido ascórbico, colesterol y glucosa se mantuvieron en sus niveles normales (3).

En 1984, Ali y Khogali realizaron una serie de experimentos en los cuales investigaron las posibles lesiones causadas por la furazolidona en el hígado, riñón, corazón, cerebelo, cerebro y testículos así como los cambios que ocurren en los constituyentes del plasma de los pollos sometidos a la dosis de 0.04% y 0.08% peso/peso durante 10 días. En el grupo sometido a la dosis de 0.04% peso/peso no se encontraron lesiones a nivel histológico ni tampoco en los constituyentes del plasma, en cambio en el

grupo tratado con 0.08% las concentraciones de colesterol y sodio experimentaron una baja mientras que la concentración total de proteínas, de potasio y de colesterol se incrementó significativamente. Las lesiones histológicas más evidentes fueron la congestión en el hígado con edema y hemorragias, en el corazón, hubo congestión de vasos sanguíneos y degeneración de algunas células de Purkinje en el cerebelo. A nivel testicular se encontró degeneración de los túbulos seminíferos (5).

Hernández, Revilla y Velasco-Monterrubio (1982), adicionaron a la dieta de gallos semipesados de 2 meses de edad, 0.011% de turazolidona durante dos meses y 0.022% durante 15 días, encontrando en ambos grupos una disminución en el peso testicular pero no estadísticamente significativa. En cuanto a las medidas de las crestas y las barbillas tampoco encontraron diferencia significativa. A nivel histológico observaron la detención del proceso espermatogénico en la fase de espermatocito primario en paquiteno con presencia de vacuolas dentro del núcleo. La microscopía electrónica reveló la presencia de lesiones en la membrana nuclear de los espermatocitos primarios. En el grupo con 0.011%, se encontraron en los espermatocitos primarios vacuolas dentro del núcleo.

En el grupo con 0.022% la estructura del núcleo se modificó por la pérdida de fluidos nucleares y del material granular fino (25).

Ali y Khogali (1984) y Zermeño (1984) demostraron que en los gallos a los que se les incluyo en la dieta una dosis de furazolidona de 0.08% peso/peso durante 5 días provoca en el testículo una reducción significativa en el tamaño y el peso de los mismos con una consecuente reducción en la producción espermática (5-64).

Zermeño y Paasch (1984) en gallos semipesados tratados con 0.022% de furazolidona, detectaron una disminución en la motilidad y densidad espermática e incremento en el porcentaje de espermatozoides anormales a partir del decimotercer día de tratamiento. En el grupo con 0.04% de furazolidona las anomalías espermáticas se incrementaban al tercer día de iniciado el tratamiento (64-65).

Plam, et al (1952), utilizando una dosis de furazolidona de 500 mg/kg de peso en ratas encontraron que había una reducción del 30% de la cantidad de catecolaminas en la médula adrenal (46).

En 1983, Powers demostró que la furazolidona es un potente inhibidor de la monoaminaoxidasa, enzima que está presente en todos los tejidos del cuerpo y que interviene en la oxidación de las catecolaminas, por lo que su inhibición en el corazón de las ratas provoca la acumulación del tejido vasopresor, causando hipertensión, cardiomegalia y cardiomiopatía.

Satoru, et al (1977), incluyeron en la dieta de ratas hembras y

machos, dosis de 100, 400, 700 y 1000 p.p.m. de furazolidona durante 30 días, con el fin de determinar los cambios que ocurren en el testículo, ovario y estómago de estos animales, encontrando que el peso de los testículos disminuía en los grupos que tomaron 400, 700 y 1000 p.p.m., siendo esta lesión confirmada por los estudios histológicos en los cuales se observó que había un número reducido de espermátidas y de espermatozoides en los túbulos seminíferos. Las células que se encontraron en mayor número fueron los espermatoцитos primarios en la fase de paquiteno. A nivel de los ovarios observaron que los folículos experimentaron una degeneración, en particular en las células de la granulosa, las cuales presentaban destrucción muy marcada en los animales que fueron sometidos a la dosis de 1000 p.p.m., mientras que con las dosis menores las lesiones que se presentaron fueron más discretas (50).

Koeda, et al (1977) en los cobayos a los que se administraron 200, 400, 700, 800 y 1000 p.p.m. de furazolidona durante 30 días encontraron una hipertrofia nodular en la mucosa gástrica y las glándulas adrenales experimentaron una reducción a un tercio de su tamaño normal (29).

Hernández Jáuregui et al, en 1985 trabajando con ratones machos sometidos al tratamiento con 0.011%, 0.022% y 0.033% de furazolidona durante dos meses y de 0.066% durante 15 días observaron que el tratamiento no afectó el peso ni el tamaño de

los testículos en los grupos a los que se les administró 0.011%, 0.022% y 0.033%. A nivel histológico el análisis de los túbulos seminíferos no reveló alteración alguna. Los niveles hormonales de testosterona, androstendiona y dihidrotestosterona se conservaron en sus valores normales. Todos los animales de estos grupos fueron fértiles, con crías normales. En el grupo sometido a 0.066% se encontró una ligera disminución en el peso de los testículos después de un mes de tratamiento, en los túbulos seminíferos de estos animales se encontró un número reducido de espermátidas, las células presentes en mayor proporción fueron los espermatoцитos primarios en fase de paquiteno, con el citoplasma vacuolado y el núcleo intensamente teñido. Los niveles de androstendiona experimentaron una variación que no fue significativa con relación al grupo testigo, estos resultados se confirmaron por la presencia de las células de Leydig normales tanto en número como en su morfología. Los animales de este grupo fueron infértiles después de un mes de tratamiento y al cabo de un mes de suspendido el tratamiento recuperaron la fertilidad dando crías normales (24).

La furazolidona, un antimicrobiano de amplio espectro, ha demostrado tener un efecto sobre la espermatogénesis de diferentes grupos zoológicos, sin embargo no se conocen las dosis exactas a las cuales se pueda inducir la oligospermia incompatible con la fertilidad.

Teniendo en cuenta lo anterior, se planteó la necesidad de encontrar la dosis de furazolidona capaz de inducir la oligospermia incompatible con la fertilidad, que no afecte la libido, no dañe otros órganos, no tenga efectos colaterales y que sea reversible cumpliendo así con los requisitos de un anticonceptivo masculino ideal. Para ello se seleccionó al conejo como modelo animal y la administración diaria de 50 mg. de furazolidona por kg. de peso corporal suspendida en aceite vegetal.

III HIPOTESIS

La administración oral de una dosis diaria de furazolidona de 50 mg/Kg de peso, suspendida en aceite vegetal induce en el conejo oligospermia, incompatible con la fertilidad que sin producir efectos colaterales será reversible una vez suspendida su administración.

IV OBJETIVOS

- 1.- Inducir oligospermia incompatible con la fertilidad en los conejos, administrando oralmente una dosis diaria de 50 mg/Kg de peso de furazolidona suspendida en aceite vegetal.
- 2.- Determinar el efecto de la furazolidona sobre el volumen, densidad, motilidad y viabilidad de los espermatozoides en el eyaculado.
- 3.- Analizar la estructura de los espermatozoides, antes, durante y después de suspendido el tratamiento con furazolidona.
- 4.- Evaluar los niveles séricos de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona, antes, durante y después del tratamiento.
- 5.- Demostrar la infertilidad de los conejos oligospermicos mediante una prueba de fertilidad.

- 6.- Demostrar la reversibilidad del efecto de la furazolidona después de suspendido el tratamiento.
- 7.- Comprobar que la dosis administrada no produce lesiones en otros órganos.
- 8.- Determinar el efecto de la furazolidona sobre la conducta sexual de los organismos durante y después del tratamiento.
- 9.- Demostrar que la administración de furazolidona no afecta el número y la estructura macroscópica de la descendencia.

V MATERIAL Y METODO

Se utilizaron 7 conejos machos sexualmente maduros de la raza Nueva Zelanda, de aproximadamente 4 meses de edad. Los animales se colocaron en jaulas independientes bajo condiciones de bioterio, con temperatura controlada, periodos de luz-oscuridad constante y con acceso libre al agua y al alimento.

V.1 PRUEBA DE FERTILIDAD (1)

Antes de iniciar el tratamiento, a cada conejo se le hizo una prueba de fertilidad para lo cual se utilizaron hembras de fertilidad comprobada, a las que se inyectó intramuscularmente una dosis diaria de 10 mg de benzoato de estradiol en 0.1 ml. de aceite de malz durante 3 días. A cada macho se le permitió montar dos veces a la hembra y para comprobar que la monta había sido efectiva, se hicieron frotis vaginales. Una vez confirmada la fertilidad (con productos vivos) de todos los conejos se formaron los lotes.

V.2 LOTES EXPERIMENTAL Y TESTIGO

Lote I experimental, con seis conejos a los que se les administró por vía oral a través de una sonda de 2.4 mm de diámetro una dosis diaria de 50 mg/kg de peso de furazolidona (Norwich) suspendida en 1.0 ml. aceite vegetal (Mazola).

Lote II testigo, con un conejo al que se le administró 1.0 ml. de aceite vegetal.

La administración se prolongó hasta lograr la oligospermia en los animales experimentales.

V.3 COLECTA DE SEMEN

Para la obtención del semen se utilizó una vagina artificial (fig. 1), la cual se armaba con una manguera de plástico, un tubo penrose del No.1 y ligas. El tubo penrose se introducía en la manguera de plástico y se doblaba un extremo sobre la manguera, en este extremo se colocaba el tubo colector graduado, por el extremo opuesto se vaciaba agua caliente a la cámara que se formaba entre el tubo penrose y la manguera, el extremo libre se doblaba sobre la manguera y a través del orificio en el extremo anterior se soplaba aire con el fin de que la vagina obtuviera presión adecuada y con temperatura interna entre 40-45°C. Una vez armada la vagina se aplicaba un poco de glicerina como lubricante en el extremo anterior de la vagina, se pegaba al abdomen de una hembra que servía como cebo y se dejaba que el macho la montara, desviando el pene para que la eyacuación ocurriera en el interior de la vagina artificial.

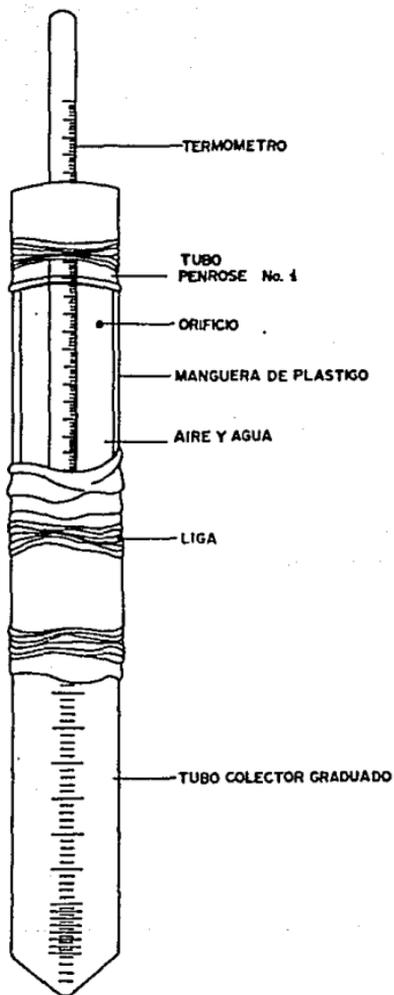


FIG. 1 VAGINA ARTIFICIAL PREPARADA PARA OBTENER SEMEN FRESCO
LA TEMPERATURA INTERNA DE LA VAGINA ES DE 40-45° C.

V.4 ESPERMATOBIOSCOPIA

V.4.1 VOLUMEN. El volumen se midió directamente en el tubo colector graduado de la vagina artificial. Si el eyaculado presentaba gel, éste se separaba para medir el volumen real.

V.4.2 MOTILIDAD. Se determinó colocando una gota de la muestra recién obtenida sobre un portaobjetos precalentado, sobre el cual se colocó un cubreobjetos. Con el objetivo de 40x, se analizaron varios campos de la preparación determinándose el porcentaje de espermatozoides con movimiento.

V.4.3 DENSIDAD. Para determinar la densidad espermática se utilizó una cámara de Neubauer (American Optical). Se tomó una fracción de la muestra, se hizo una dilución 1:10 en azida de sodio al 0.01% y se colocó una gota en la cámara. Con el objetivo de 40x se contaron los espermatozoides presentes en los cuadrantes externos y el central (ver anexo 1). Cada conteo se hizo por duplicado y el número obtenido se multiplicó por 500 000 para obtener el número de células por mililitro.

V.4.4 MORTALIDAD. La mortalidad espermática de cada muestra se determinó en frotis de semen teñidos con ebsina-nigrosina para lo cual se mezcló una gota del colorante con una gota del eyaculado. Las preparaciones se analizaron con el objetivo de 100x, contando 100 células y obteniendo el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (teñidos).

V.4.5 MALFORMACIONES. En los mismos fróntis teñidos utilizados para la determinación de la mortalidad, se determinó el porcentaje de malformaciones espermáticas así como el tipo y frecuencia en que se presentaban.

V.5 NIVELES HORMONALES

Para determinar los niveles hormonales se tomaron 3 ml. de sangre de la arteria central de la oreja y se centrifugaron a 900 r.p.m. durante 10 minutos, el sobrenadante se separó y se almacenó a -20°C. Posteriormente por radioinmunoanálisis se determinaron las concentraciones de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona (ver anexo 2).

Las muestras se tomaron cada mes y todas las determinaciones se realizaron antes(basales), durante el tratamiento y en el periodo de recuperación.

V.6 PRUEBA DE FERTILIDAD (2)

Una vez lograda la oligospermia, se realizaron montas con hembras fértiles para comprobar la infertilidad de los animales tratados y la fertilidad del testigo.

V.7 SUSPENSION DEL MEDICAMENTO

Una vez demostrada la infertilidad de los animales tratados, se suspendió la administración del fármaco a los animales experimentales y el aceite al testigo.

V.8 ESTUDIO HISTOLOGICO I

Una vez lograda la oligospermia y suspendido el tratamiento, a todos los animales se les extirpó el testículo derecho bajo anestesia con 20 mg. de ketalar/Kg., 1 mg. de droperidol/kg. intramuscular, 10-15 mg. de pentobarbital/Kg. intravenosa (lentamente), el testículo se fijó en Bouin durante 18 horas y posteriormente se pasó a alcohol al 70%. Cada testículo se pesó y procesó con técnicas convencionales, tñéndose con hematoxilina-eosina para su estudio histológico.

V.9 RECUPERACION

Durante el tiempo en que los animales permanecieron en recuperación, se les tomaron muestras de semen y sangre cada mes, hasta que los niveles espermáticos alcanzaron la normalidad, después de lo cual se les realizó otra prueba de fertilidad.

V.10 CONDUCTA SEXUAL

A lo largo del tratamiento, así como en el periodo de recuperación, se observó la conducta sexual de los machos tratados y del testigo.

V.11 CONDICIONES DE LA DESCENDENCIA

Transcurrido el tiempo de gestación (30-32 días) se determinó el número de productos y su estructura macroscópica dentro de las 24 horas posteriores al nacimiento.

V.12 ESTUDIO HISTOLOGICO II

Una vez demostrada la fertilidad de los conejos tratados, se procedió a sacrificar a los animales por electro-shock. Se extirparon los testículos y se pesaron. Se tomaron muestras de hígado, estómago, intestino, suprarrenales y epididimo fijándolos en formol al 10%. Todos los tejidos se procesaron de acuerdo a las técnicas convencionales, tificándose con hematoxilina-eosina para su estudio al microscopio de luz.

V.13 PRUEBA ESTADISTICA

Los datos se analizaron estadísticamente por la prueba de RANGO CON SIGNO, que supone dos muestras relacionadas con una variable de interés de tipo continuo. Se suponen dos muestras porque se

compararon, el nivel antes del tratamiento contra la oligospermia para determinar si hubo efecto del medicamento y el nivel antes del tratamiento contra la recuperación para comprobar si se llegó a los niveles normales al final del periodo de recuperación.

VI RESULTADOS

VI.1 PRUEBA DE FERTILIDAD (1)

La prueba de fertilidad previa al inicio del tratamiento fue positiva para todos los conejos que se agruparon en los diferentes lotes.

VI.2 ESPERMATOBIOSCOPIA

VI.2.1 VOLUMEN. La tabla I gráfica 1 muestra el volumen (ml.) de los eyaculados de los conejos experimentales (1,2,6,7,8 y 9) y el testigo (4), antes (b1, b2), durante (A-J) y después de suspendida la administración de turacolidona y realizada la orquitectomía unilateral (J-D). No se observó ningún cambio significativo en este parámetro conservándose el volumen dentro de los rangos normales (0.75 - 1.5 ml) a lo largo de todo el experimento.

VI.2.2 MOTILIDAD. En la tabla II gráfica 2 se observan los porcentajes de motilidad espermática a partir de los cuales se puede demostrar una disminución significativa de la motilidad 6 meses después de iniciado el tratamiento, recuperándose en los conejos 1, 6, 7, 9 a los 3 meses de suspendido el tratamiento y realizada la orquitectomía unilateral.

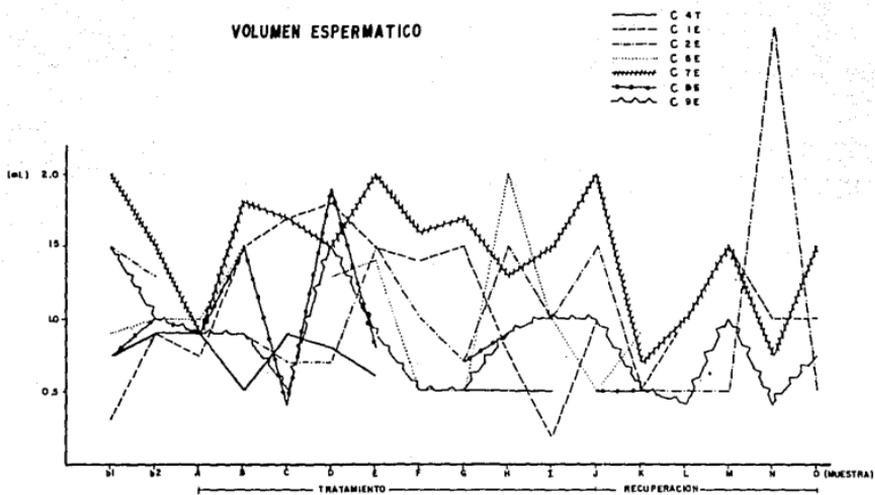
MUESTRA	VOLUMEN						
	1 E	2 E	6 E	7 E	8 E	9 E	4 T
b1	0.3	1.5	0.9	2.0	0.75	1.5	0.75
b2	0.9	1.3	1.0	1.5	1.0	1.0	0.9
A	0.75	-	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9
B	1.5	0.9	1.5	1.0	1.5	0.9	0.5
C	1.7	0.7	-	1.7	0.4	0.5	0.9
D	1.8	0.7	1.3	1.5	1.9	1.5	0.8
E	1.5	1.5	1.4	2.0	0.8	0.9	0.6
F	1.4	1.0	0.5	1.6	-	0.5	-
G	1.5	0.7	0.5	1.7	0.7	0.5	0.5
H	0.75	1.5	2.0	1.3	0.9	0.9	0.5
I	0.2	1.0	1.0	1.5	-	1.0	0.5
J	1.0	1.5	0.5	2.0	0.5	1.0	+
K	0.5	0.5	0.9	0.7	0.5	0.5	+
L	1.0	0.5	1.0	1.0	+	0.4	+
M	1.5	0.5	1.0	1.5	+	1.0	+
N	1.0	3.0	-	0.75	+	0.5	+
O	1.0	0.5	1.0	1.5	+	0.75	+

— NO HUBO MUESTRA
+ CONEJO MUERTO

TABLA 1. Volumen del eyaculado (ml.)

Dosis de 50 mg/kg de peso de furazolidona en aceite vegetal

VOLUMEN ESPERMATICO



GRAFICA 1 : VOLUMEN DEL EYACULADO (ml)
DOSIS DE 50 mg/kg DE PESO DE FURAZOLIDONA EN ACEITE VEGETAL

MOTILIDAD ESPERMÁTICA

CONEJO	1 E	2 E	6 E	7 E	8 E	9 E	4 T
MUESTRA							
b1	70	70	65	70	70	70	40
b2	70	70	70	80	80	70	80
A	50	-	70	60	60	70	70
B	60	50	40	60	70	70	60
C	75	40	-	60	60	40	70
D	50	40	70	-	30	30	70
E	70	60	65	30	65	40	85
F	60	70	75	30	-	40	-
G	60	70	30	50	70	10	80
H	40	40	75	15	75	0	75
I	20	75	30	30	-	25	85
J	60	-	50	40	10	40	+
K	60	-	5	10	20	60	+
L	80	30	65	65	+	85	+
M	30	10	80	50	+	80	+
N	75	5	-	30	+	20	+
O	85	5	50	60	+	85	+

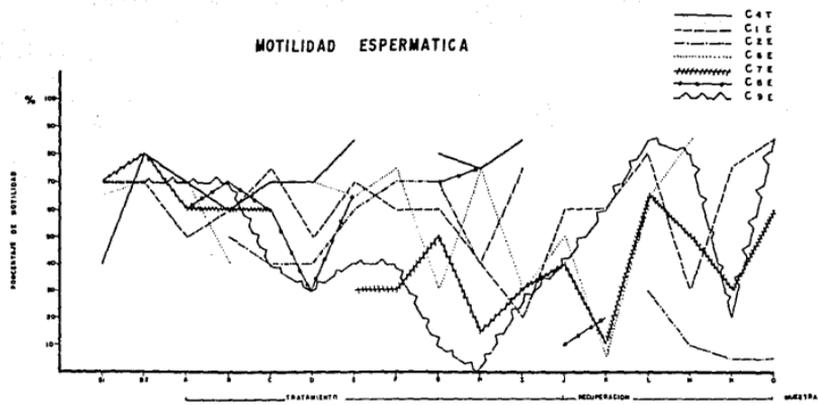
- NO HUBO MUESTRA

+ CONEJO MUERTO

TABLA 11. Motilidad espermática (%)

Dosis de 50 mg/kg de peso de furazolidona en aceite vegetal

MOTILIDAD ESPERMATICA



GRAFICA 2: MOTILIDAD ESPERMATICA (PORCENTAJE DE MOTILIDAD)
DOSIS DE 50 mg/kg DE PESO DE FURAZOLIDONA EN ACEITE VEGETAL

VI.2.3 DENSIDAD En la tabla III gráfica 3 se observa la densidad espermática (número de espermatozoides/ml.) de los eyaculados de los conejos tanto experimentales como testigo. En esta tabla se demuestra que la oligospermia se logró 6 meses después de iniciado el tratamiento, entonces se practicó la prueba de fertilidad (2) obteniéndose resultados negativos, 2 meses después se realizó la orquitectomía unilateral y desde ese momento los animales permanecieron en recuperación hasta que la cuenta espermática alcanzó sus valores normales a los tres meses de suspendido el medicamento lo cual se comprobó mediante una prueba de fertilidad con resultados positivos.

VI.2.4 MORTALIDAD. En la tabla IV gráfica 4 se presentan los porcentajes de mortalidad, en ella se observa que el porcentaje de espermatozoides muertos aumenta significativamente ($p = 0.07$) 6 meses después de iniciado el tratamiento. Estos valores disminuyen 3 meses después de suspendida la administración de furazolidona y realizada la orquitectomía unilateral.

VI.2.5 MALFORMACIONES. En la tabla V gráfica 5 se observa el porcentaje de malformaciones, encontrándose un aumento significativo ($p = 0.07$) de éstas a los 6 meses de iniciado el tratamiento. coincidiendo este aumento con la oligospermia. Se hizo el estudio cualitativo donde se encontró que las principales

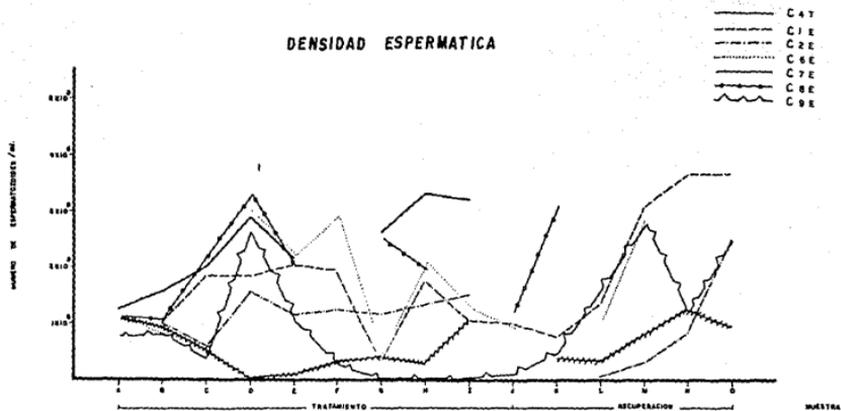
DENSIDAD ESPERMÁTICA

CONEJO	1 E	2 E	6 E	7 E	8 E	9 E	4 T
MUESTRA							
A	86	-	109.7	112.5	112.5	77.5	126.3
B	94.5	104	78	93.5	104.5	83	154.5
C	178.5	61.6	-	56	217.5	42	203.5
D	182.5	154.5	297	6	329.5	263	292
E	205	116	221.2	8	208	109.5	214
F	192.3	125.3	289	38.2	-	29.7	-
G	28.1	116.3	46.7	41.4	248.5	8.5	261.8
H	173.8	135.5	205.5	30.3	196.3	8.5	332.6
I	109.4	151.6	126.7	105.1	-	7	321.7
J	95	-	88.7	-	114	11.2	+
K	71.5	-	-	39.7	311	50.6	+
L	129.9	1.5	104.5	33.1	+	159.6	+
M	304.6	30	276.1	74.2	+	275.6	+
N	361.5	87.5	-	127.5	+	118.1	+
O	360.5	251.6	54.3	95.7	+	247.5	+
-	NO HUBO MUESTRA						
+	CONEJO MUERTO						

TABLA 111. Densidad espermática (No. de espermatozoides/ml. $\times 10^6$)

Dosis de 50 mg/kg de peso de furazolidona en aceite vegetal

DENSIDAD ESPERMATICA



GRAFICA 3 : DENSIDAD ESPERMATICA (Nº DE ESPERMATOZOIDES / ml.)
DOSES DE 50 mg /kg DE PESO DE FURAZOLIDONA EN ACEITE VEGETAL

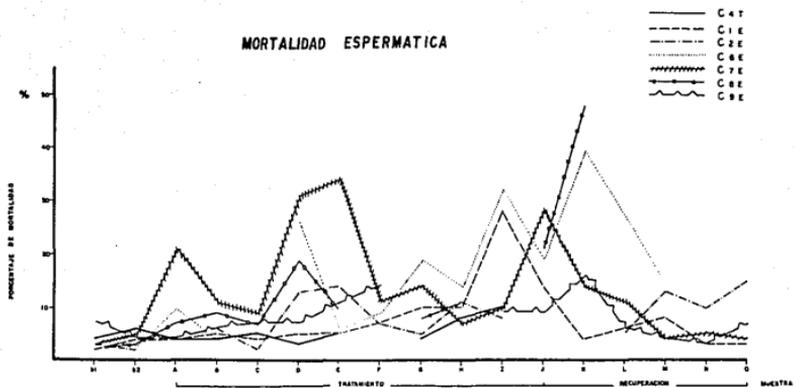
MORTALIDAD ESPERMÁTICA								
CONEJO	1E	2E	6E	7E	8E	9E	4T	
MUESTRA								
b1	2	3	4	3	2	7	4	
b2	4	2	3	5	3	4	6	
A	4	-	10	21	7	4	4	
B	5	6	4	11	9	6	4	
C	4	2	-	9	7	7	5	
D	5	13	26	31	19	7	3	
E	5	14	6	34	10	11	5	
F	7	7	9	11	-	14	-	
G	10	5	19	14	8	-	4	
H	10	11	14	7	11	-	8	
I	20	8	32	10	-	9	10	
J	14	-	19	20	21	9	+	
K	4	-	39	14	48	16	+	
L	6	5	27	11	+	6	+	
M	8	13	14	4	+	4	+	
N	3	10	-	5	+	3	+	
O	3	15	14	4	+	7	+	

- NO HUBO MUESTRA

+ CONEJO MUERTO

TABLA IV. Mortalidad espermática (%)

Dosis de 50 mg/kg de peso de furazolidona en aceite vegetal



GRAFICA 4: MORTALIDAD ESPERMATICA (PORCENTAJE DE MORTALIDAD)
 DOSIS DE 50 mg./Kg. DE PESO DE FURAZOLIDONA EN ACEITE VEGETAL

MALFORMACIONES ESPERMATICAS

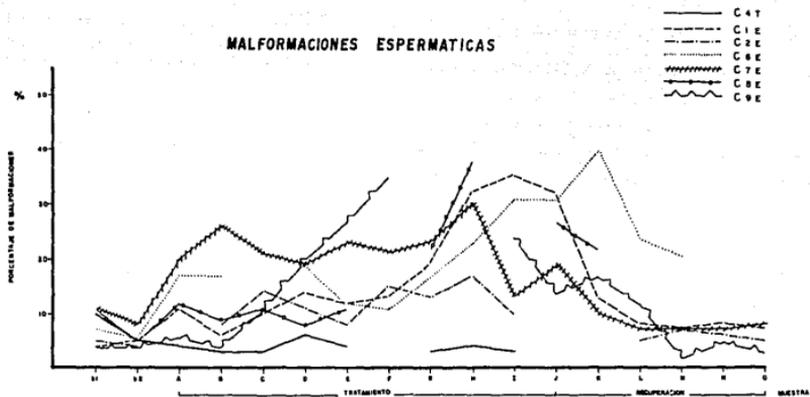
	CONEJO	1 E	2 E	6 E	7 E	8 E	9 E	4 T
MUESTRA								
b1		4	5	7	11	11	4	18
b2		5	4	5	8	5	4	5
A		11	-	17	20	12	6	4
B		6	8	17	26	9	4	3
C		10	14	-	21	11	11	3
D		14	11	19	19	8	20	6
E		12	8	12	23	11	27	4
F		13	15	11	21	-	35	-
G		19	13	17	23	22	-	3
H		32	17	23	30	30	-	4
I		35	10	31	13	-	24	3
J		32	-	31	19	27	14	+
K		13	-	40	10	22	17	+
L		8	5	24	7	+	12	+
M		7	7	21	7	+	2	+
N		8	6	-	7	+	5	+
O		7	5	14	8	+	3	+

- NO HUBO MUESTRA

+ CONEJO MUERTO

TABLA V. Malformaciones espermáticas (%)

Dosis de 50 mg/kg de peso de furazolidona en aceite vegetal



GRAFICA 5: MALFORMACIONES ESPERMATICAS (PORCENTAJE DE MALFORMACIONES)
 DOSIS DE 50 mg./kg. DE PESO DE FURAZOLIDONA EN ACEITE VEGETAL

MICROGRAFIA 1-2

Muestran los diferentes tipos de malformaciones presentes en los eyaculados de los conejos experimentales tratados con 50 mg/kg de peso corporal.

fs - flagelo suelto

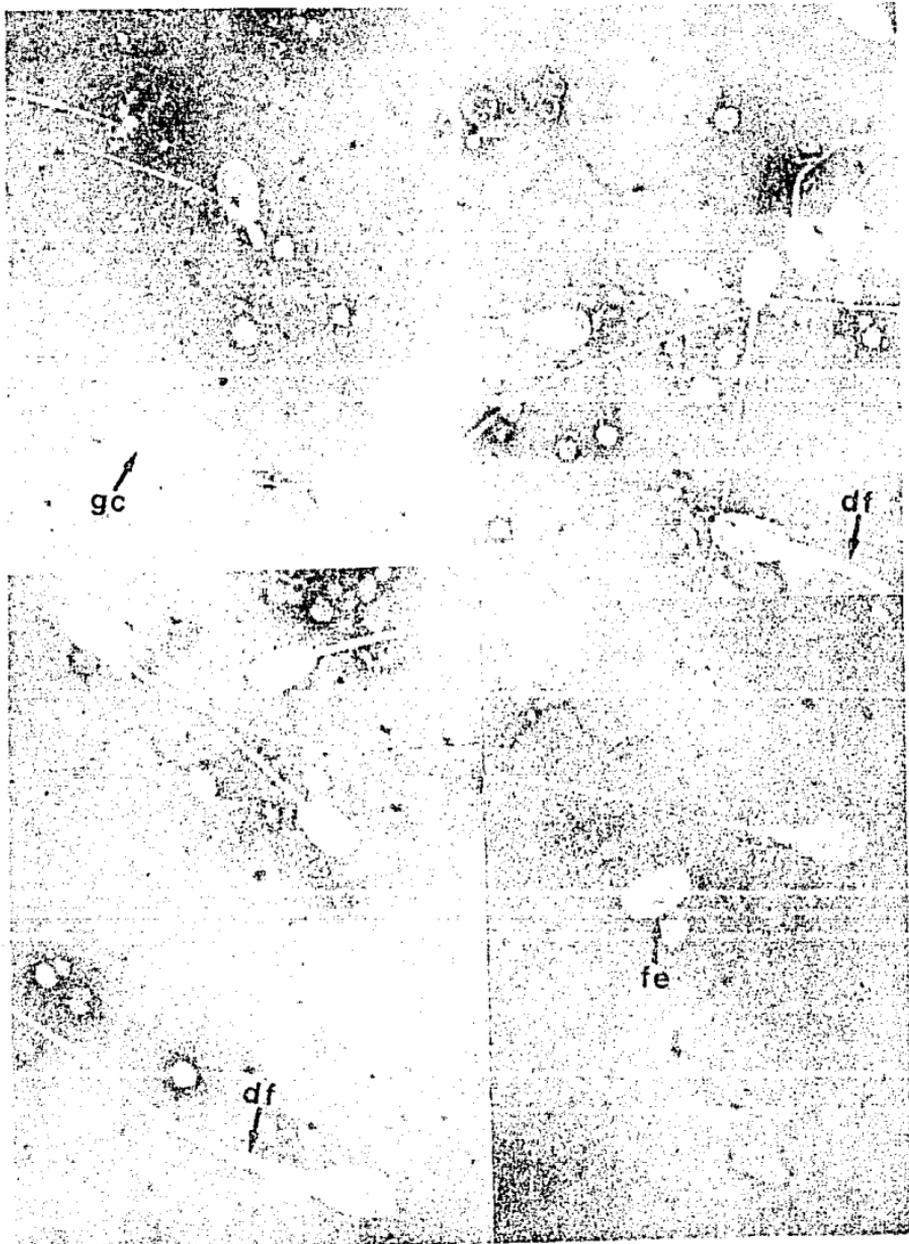
fe - flagelo enrollado

em - espermatozoide muerto

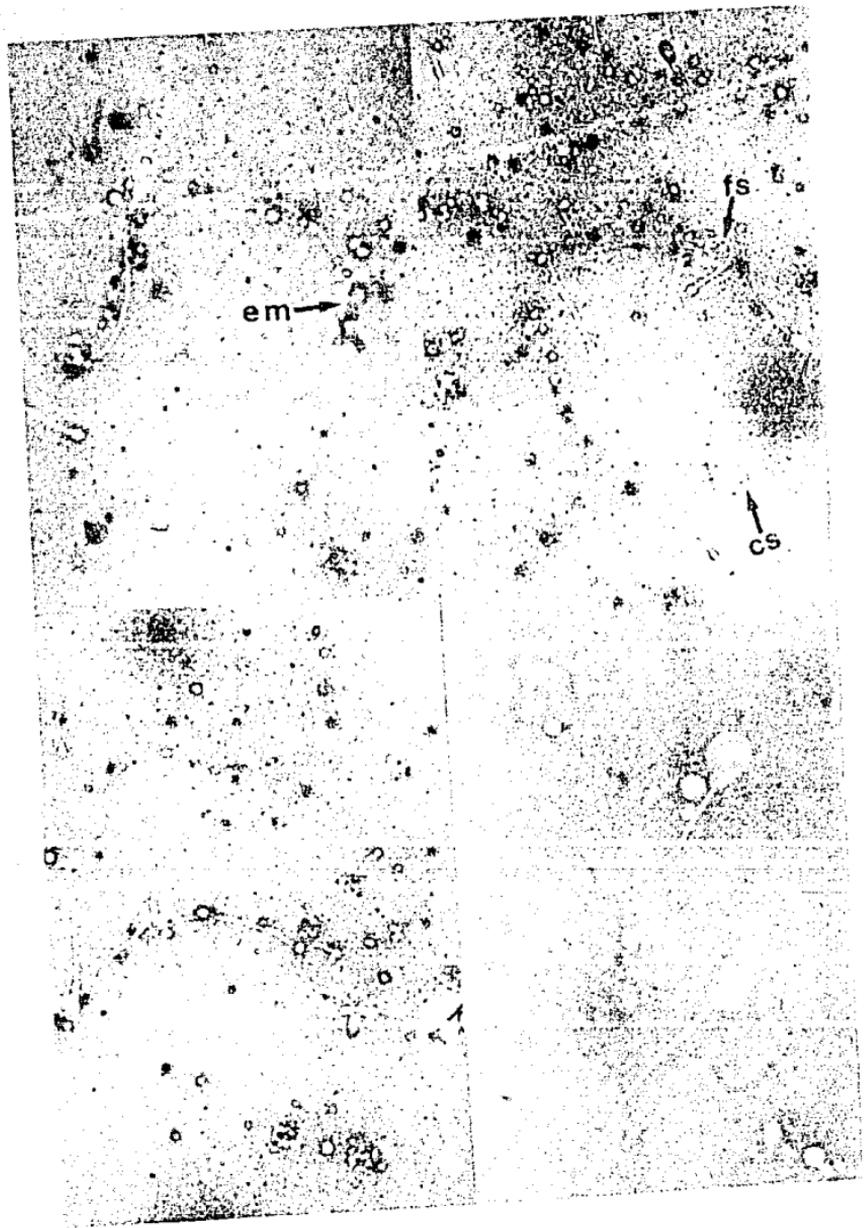
gc - gota citoplásmica

cs - cabeza suelta

df - doble flagelo



MICROGRAFIA 2



malformaciones fueron: espermatozoides con el flagelo enrollado 65%, espermatozoides con gota citoplásmica a nivel del segmento intermedio 25%, espermatozoides con doble flagelo 5%, cabezas y flagelos sueltas 5% y el resto malformaciones poco frecuentes como cabezas deformes o reducidas. (micrografías 1-2) Los valores normales se recuperaron 3 meses después de suspendida la administración del medicamento.

VI.3 NIVELES HORMONALES.

La tabla VI gráfica 6 presenta los valores de testosterona (ng/ml.) antes (bi), durante (A-J) y después de suspendido el tratamiento con furazolidona (J-U). El análisis de estos valores demuestran que no hay cambio significativo durante el experimento y los valores se conservaron dentro del rango normal.

En la tabla VII gráfica 7 se observan los valores de la concentración de dihidrotestosterona (ng/ml.), observándose que tampoco son afectados los niveles de esta hormona a lo largo de todo el experimento.

En la tabla VIII gráfica 8 se muestran los valores de androstendiona (ng/ml.) a lo largo de todo el experimento, observándose que no hay cambios significativos en estos valores y que permanecen dentro del rango normal.

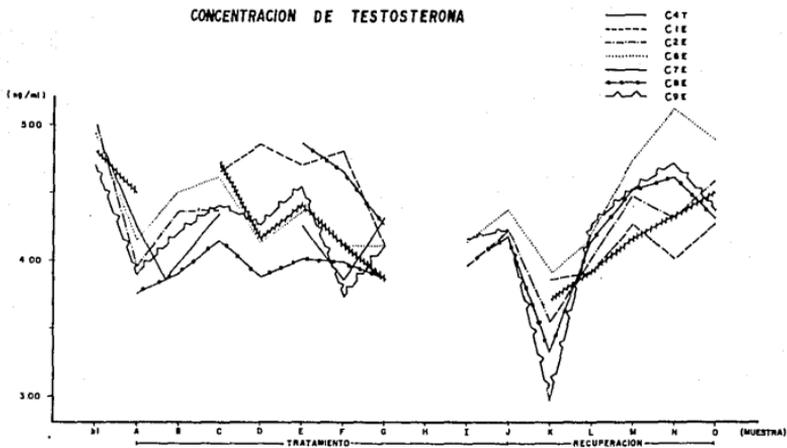
CONCENTRACION DE TESTOSTERONA

CONEJO	1E	2E	6E	7E	8E	9E	4T
MUESTRA							
b1	-	5.00	4.96	4.80	-	4.71	4.87
A	4.36	3.97	4.16	4.56	3.75	3.94	4.24
B	-	4.36	4.53	-	3.97	4.20	3.86
C	4.65	4.36	4.62	4.71	4.14	4.40	4.35
D	4.85	-	4.12	4.15	3.87	4.25	-
E	4.71	4.85	4.36	4.40	4.07	4.54	4.25
F	4.86	4.56	4.10	4.10	3.99	3.72	3.85
G	4.10	4.25	4.10	3.85	3.85	4.10	4.30
H	-	-	-	-	-	-	-
I	4.00	3.95	4.12	4.20	3.99	4.15	4.05
J	-	4.20	4.36	-	4.16	4.20	+
K	3.85	3.54	3.90	3.70	3.42	2.85	+
L	3.90	4.00	4.15	3.87	4.12	4.25	+
M	4.25	4.40	4.73	4.15	4.50	4.50	+
N	4.07	4.30	5.10	4.30	4.60	4.70	+
O	4.26	4.58	4.89	4.51	4.31	4.35	+
-	NO HUBO MUESTRA						
+	CONEJO MUERTO						

TABLA VI. Concentración de testosterona (ng/ml)

Dosis de 50 mg/kg de peso de furazolidona en aceite vegetal

CONCENTRACION DE TESTOSTERONA



GRAFICA 6 : CONCENTRACION DE TESTOSTERONA (ng/ml.)
 DOSIS DE 50 mg/Kg DE PESO DE FURAZOLIDONA EN ACEITE VEGETAL

CONCENTRACION DE DIHIDROTESTOSTERONA

CONEJO	1 E	2 E	6 E	7 E	8 E	9 E	4 T
MUESTRA							
b1	-	0.460	0.450	0.380	-	0.410	0.395
A	0.380	0.315	0.407	0.395	0.415	0.354	0.396
B	-	0.396	0.400	-	0.420	0.380	0.390
C	0.365	0.400	0.453	0.380	0.410	0.370	0.380
D	0.390	-	0.410	0.390	0.360	0.412	-
E	0.471	0.395	0.400	0.370	0.400	0.400	0.410
F	0.412	0.385	0.371	0.305	0.385	0.310	0.351
G	0.351	0.410	0.390	0.400	0.370	0.390	0.390
H	-	-	-	-	-	-	-
I	0.400	0.370	0.395	0.390	0.390	0.405	0.410
J	-	0.410	0.400	-	0.410	0.375	+
K	0.385	0.390	0.370	0.370	0.354	0.190	+
L	0.390	0.415	0.385	0.390	0.350	0.351	+
M	0.425	0.440	0.410	0.370	0.375	0.385	+
N	0.417	0.405	0.400	0.350	0.305	0.410	+
O	0.435	0.459	0.390	0.380	0.405	0.400	+

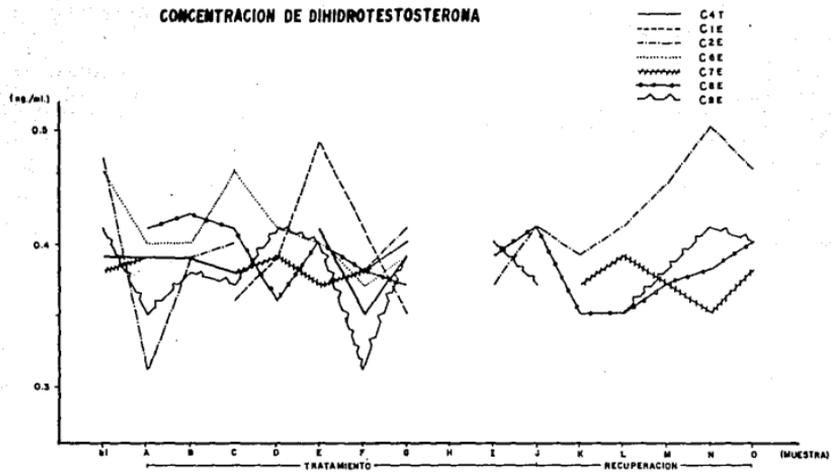
- NO HUBO MUESTRA

+ CONEJO MUERTO

TABLA VII. Concentración de dihidrotestosterona (ng/ml)

Dosis de 50 mg/kg de peso de furazolidona en aceite vegetal

CONCENTRACION DE DIHIDROTESTOSTERONA



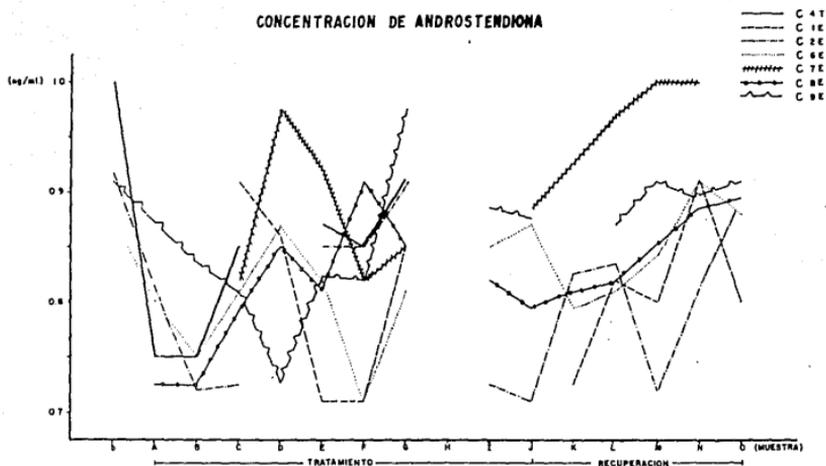
GRAFICA 7 : CONCENTRACION DE DIHIDROTESTOSTERONA (ng/ml.)
 DOSIS DE 50 mg/Kg DE PESO DE FURAZOLOONA EN ACEITE VEGETAL

CONCENTRACION DE ANDROSTENDIONA

COEJO	1E	2E	6E	7E	8E	9E	4T
MUESTRA							
D1	-	0.921	0.856	1.050	-	0.915	1.000
A	0.854	0.810	0.800	0.754	0.725	0.870	0.759
B	-	0.720	0.754	-	0.725	0.836	0.750
C	0.912	0.725	0.815	0.825	0.795	0.810	0.850
D	0.867	-	0.870	0.976	0.854	0.726	-
E	0.710	0.850	0.829	0.925	0.810	0.825	0.871
F	0.715	0.857	0.715	0.825	0.910	0.821	0.854
G	0.857	0.912	0.812	0.854	0.850	0.976	0.915
H	-	-	-	-	-	-	-
I	0.854	0.725	0.856	0.915	0.821	0.880	0.980
J	-	0.710	0.871	-	0.795	0.875	+
K	0.726	0.825	0.795	0.880	0.810	0.370	+
L	0.821	0.836	0.810	0.925	0.825	0.870	+
M	0.800	0.721	0.840	0.970	0.854	0.910	+
N	0.910	0.815	0.910	1.015	0.880	0.890	+
O	0.854	0.870	0.880	1.025	0.895	0.925	+
-	NO HUBO MUESTRA						
+	COEJO MUERTO						

TABLA VIII. Concentración de androstendiona (ng/ml)
Dosis de 50 mg/kg de peso de furazolidona en aceite vegetal

CONCENTRACION DE ANDROSTENDIONA



GRAFICA B : CONCENTRACION DE AMOROSTENDIONA (µg/ml)
 DOSIS DE 50 mg /kg DE PESO DE FURAZOLIDONA EN ACEITE VEGETAL

VI.4 PRUEBA DE FERTILIDAD (2)

La prueba de fertilidad realizada al momento de la oligospermia fue negativa para los conejos 1,2,6,7,8 y 9 por lo que se procedió a realizar la orquitectomia unilateral y a suspender el tratamiento.

VI.5 ESTUDIO HISTOLOGICO

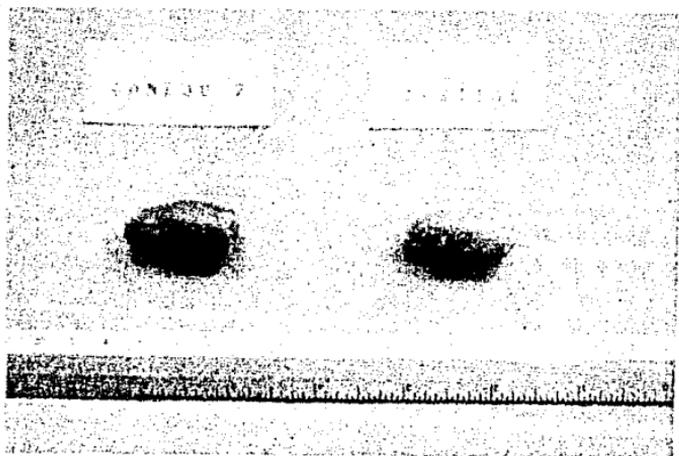
Cada uno de los testiculos extirpados se pesó y se procesó con técnicas histológicas convencionales.

PESO TESTICULAR

TRATAMIENTO		RECUPERADOS	
CONEJO 1 E	2.8 g	CONEJO 2 E	4.0 g
CONEJO 9 E	2.6 g	CONEJO 6 E	3.7 g
CONEJO 7 E	2.5 g	CONEJO 7 E	3.1 g
CONEJO 4 T	3.9 g	CONEJO 9 E	4.5 g

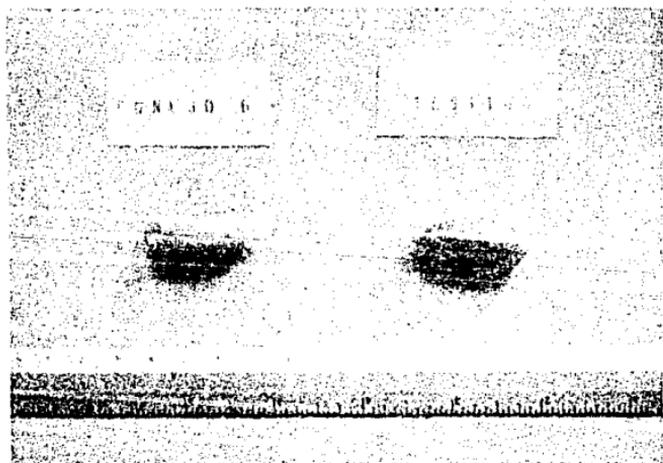
Los pesos de los testiculos obtenidos por orquitectomia unilateral presentan una disminucion con respecto al testigo y despues del periodo de recuperacion experimentan un aumento en el peso (fotografias 1-4).

El estudio histológico demostró que la espermatogénesis se encontraba detenida en espermatocito primario, no pudiendo encontrarse espermatidas ni espermatozoides. Las células de Leydig no presentaron alteraciones en ninguno de los testiculos (micrografia 3).



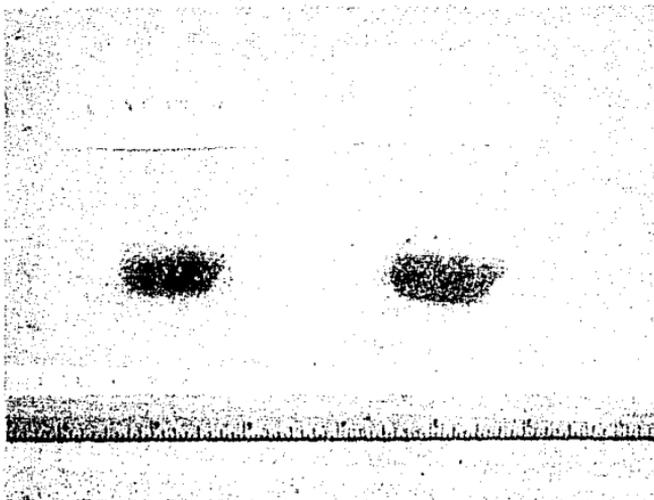
FOTOGRAFIA 1

Muestra el tamaño del testículo del conejo 2 tratado con una dosis diaria de 50 mg de furazolidona por kilogramo de peso en el momento de la oligospermia, comparado con el testículo del conejo testigo.



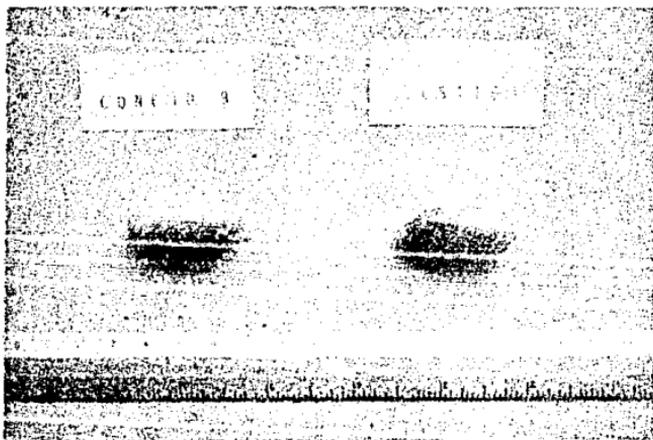
FOTOGRAFIA 2

Muestra el tamaño del testículo del conejo 6 tratado con una dosis diaria de 50 mg de furazolidona por kilogramo de peso en el momento de la oligospermia, comparado con el testículo del conejo testigo.



FOTOGRAFIA 3

Muestra el tamaño del testículo del conejo 7 tratado con una dosis diaria de 50 mg de furazolidona por kilogramo de peso en el momento de la oligospermia, comparado con el testículo del conejo testigo.



FOTOGRAFIA 4

Muestra el tamaño del testículo del conejo 9 tratado con una dosis diaria de 50 mg de furazolidona por kilogramo de peso en el momento de la oligospermia, comparado con el testículo del conejo testigo.

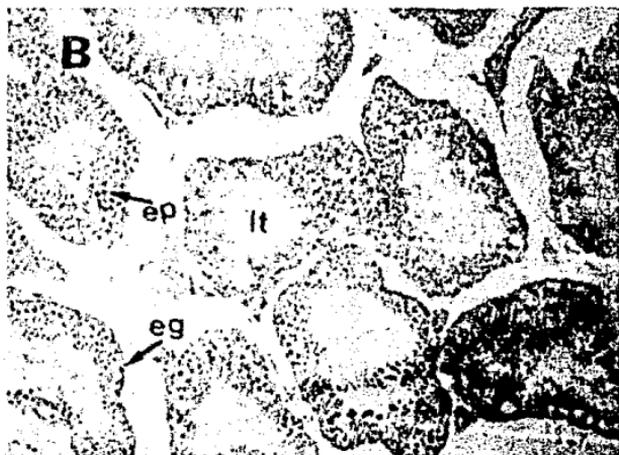
MICROGRAFIA 3

A-B Cortes de testículo de conejos tratados con una dosis diaria de 50 mg de furazolidona por kilogramo de peso corporal. Se observa el bloqueo de la espermatogénesis a nivel de espermatocito primario (ep), la presencia de espermatogonias (eg) y la ausencia de espermatozoides en la luz del túbulo.

ts - túbulo seminífero

vs - vaso sanguíneo

lt - luz del túbulo



VI.6 RECUPERACION

Tres meses después de realizada la orquitectomia y de suspendido el tratamiento, los conejos 1,6,7 y 9 recuperaron su cuenta espermática por lo que se realizó un prueba de fertilidad que resultó positiva para todos los conejos, obteniéndose descendientes normales.

VI.7 CONDUCTA SEXUAL

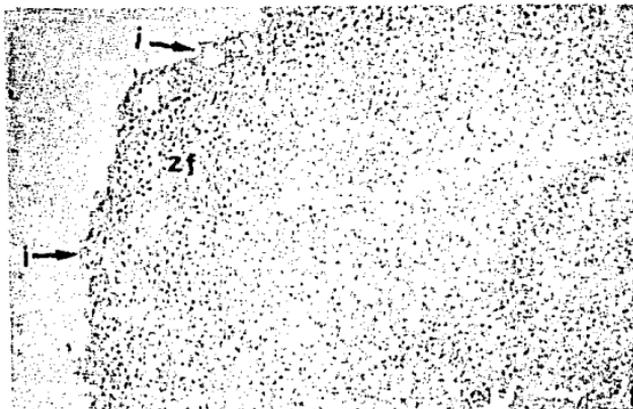
La conducta sexual a lo largo del tratamiento y durante el periodo de recuperación no se modificó en ninguno de los animales experimentales, observándose gran actividad en presencia de las hembras con montas repetidas.

VI.8 CONDICIONES DE LA DESCENDENCIA

Los descendientes obtenidos en la prueba de fertilidad posterior al periodo de recuperación fueron normales tanto en el número de productos como en su morfología externa.

VI.9 ESTUDIO HISTOLOGICO

El estudio histológico reveló que el intestino, estómago e hígado no presentaron lesiones conservando su estructura normal. En cuanto a las suprarrenales solo en el conejo 7 se observó que: la zona fascicular es corta, hay ausencia de la zona glomerulosa con irregularidades y fibrosis en la superficie adrenal (micrografía 4).



MICROGRAFIA 4

Corte de glándula suprarrenal del conejo 7 tratado con una dosis diaria de 50 mg de turazolidona por kilogramo de peso corporal en el que se muestra la reducción de la zona fascicular (zf) y la ausencia de la zona glomerulosa con irregularidades (i) y fibrosis en la superficie adrenal.



MICROGRAFIA 5

Corte de testículo de conejo tratado con una dosis diaria de 50 mg de turazolidona por kilogramo de peso corporal, 3 meses después de suspendido el tratamiento. Se observa la total recuperación de la espermatogénesis con presencia de espermatozoides en la luz del túbulo.

Los testículos de los conejos 2, 6, 7 y 9 no presentaron alteraciones, se observa la espermatogénesis completa, las células de Leydig sin alteraciones. El epidídimo no presenta lesiones y se observa una celularidad normal en los túbulos seminíferos (microfotografía 5).

VII DISCUSION

Son varios los factores endócrinos y neuroendócrinos que regulan los mecanismos fisiológicos que participan en la reproducción, maduración y transporte de los ovocitos y espermatozoides, en la fertilización e implantación, estos mecanismos involucran interacciones complejas entre el medio ambiente externo y el sistema nervioso central, las hormonas hipotalámicas, gonadotrópicas y gonadales. El conocimiento de estas interacciones ha dado por resultado el desarrollo y aplicación de diferentes métodos anticonceptivos que son el resultado de una gran cantidad de trabajos de investigación en fisiología de la reproducción.

Sin embargo la mayoría de estos estudios han sido enfocados a la anticoncepción femenina y es hasta fechas recientes en las que se ha trabajado más en la anticoncepción masculina.

La espermatogénesis es uno de los procesos sobre los cuales se ha trabajado en la búsqueda de un anticonceptivo masculino ideal que no comprometa la libido, que no dañe a otros órganos, que no tenga efectos colaterales y que sea reversible.

Por tal motivo se planteó este experimento piloto, probando una dosis diaria de 50 mg/kg. de peso de furazolidona suspendida en aceite vegetal, utilizando como modelo animal al conejo.

El análisis de los resultados obtenidos reveló que el volumen del eyaculado de los conejos tratados no sufrió cambios

significativos durante el tratamiento ni después de suspendido éste, estos resultados concuerdan con los que obtuvo Zamaro en 1984 trabajando con gallos a los que se les administraron diferentes dosis (0.01, 0.02, 0.04 y 0.13 %) de furazolidona en el alimento (63).

Zamaro en el mismo trabajo reporta no haber encontrado cambios significativo en la motilidad de los espermatozoides, sin embargo en un trabajo posterior realizado en 1985 con gallos semipesados a los que les administró una dosis de 0.022% de furazolidona en el alimento, encontró una reducción en la motilidad, siendo estos resultados semejantes a los obtenidos en este trabajo, donde la motilidad disminuyó significativamente a los 6 meses de iniciado el tratamiento, para posteriormente recuperar los valores normales a los 3 meses de suspendido el medicamento.

La densidad espermática mostró una disminución significativa a los 6 meses de iniciado el tratamiento. La prueba de fertilidad resultó negativa comprobándose así la infertilidad de todos los conejos tratados. 3 meses después de suspendido el tratamiento y de realizada la orquitectomía la densidad espermática recuperó sus valores normales. Resultados semejantes fueron reportados por Zamaro en 1984 que demostró que la densidad espermática experimentaba una disminución significativa a los 13 días después de iniciada la administración de una dosis de 0.02, 0.04, 0.13 y 0.22% de furazolidona en gallos (63, 64, 65). En gallos tratados con 100, 200, 400 y 800 p.p.m., se observó un decremento en la

cantidad de huevos fértiles en los animales tratados con 800 p.p.m. (63)

Zamora en 1984 (63) administró a gallos semipesados 0.022% de furazolidona en el alimento, encontrando que el porcentaje de anomalías se incrementaba desde el decimotercer día y que a una dosis mayor de 0.04% hacia que las anomalías se presentaran desde el tercer día después de iniciado el tratamiento. Estos resultados apoyan los obtenidos en este trabajo donde se encontró que el porcentaje de anomalías aumentó significativamente a los 6 meses de iniciado el tratamiento, recuperándose los valores después de 3 meses de suspendida la administración de la furazolidona.

La mortalidad en los animales experimentales aumentó después de 6 meses de tratamiento y al cabo de tres meses de recuperación la mortalidad disminuyó.

El análisis cualitativo reveló que el porcentaje de malformaciones se incrementó a los seis de tratamiento, siendo las malformaciones más frecuentes; espermatozoides con el flagelo enrollado, espermatozoides con gota citoplásmica a nivel del segmento intermedio, espermatozoides con doble flagelo y flagelos y cabezas sueltas. El porcentaje disminuyó después de 3 meses de recuperación.

En cuanto a los niveles hormonales. Hernández, et al en 1985 refieren que las dosis de 0.011%, 0.022% y 0.033% de furazolidona durante dos meses no modifican la concentración de hormonas en los ratones tratados, sin embargo la administración de 0.066% de furazolidona durante 15 días produce un aumento de los niveles de testosterona y dihidrotestosterona, mientras que los niveles de androstendiona disminuyen significativamente, con la misma dosis para posteriormente recuperar los niveles normales con la suspensión del medicamento. En el desarrollo de este trabajo los niveles de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona no sufrieron modificación a lo largo del tratamiento y el periodo de recuperación.

Por otra parte la conducta sexual de todos los machos sometidos al tratamiento de furazolidona, no sufrió ninguna alteración, observándose una actividad normal de los machos en presencia de una hembra.

En estudios previos se han observado modificaciones histológicas que se presentan a nivel de los túbulos seminíferos de gallos, ratas y ratones sometidos a diferentes dosis de furazolidona. Paul, et al (41) en ratas sometidas a una dosis de 0.01% de furazolidona durante 2 semanas, observaron que había un decremento en el tamaño de los testículos. Satoru, et al (50) en cobayos a los que les incluyeron en la dieta diferentes dosis (400, 700 y 1000 p.p.m.) de furazolidona durante 2 meses, encontraron una disminución en el peso testicular. Hernández,

Jáuregui, et al (1982) encontraron disminución en el peso testicular de los gallos sometidos al tratamiento con 0.01% durante 2 meses de furazolidona y con los sometidos a la dosis de 0.022% durante 15 días. Posteriormente Ali y Khogali en 1984 y Zermeño en 1984 reportaron que en los gallos sometidos a una dosis de 0.08 peso/peso durante 5 días, el peso testicular experimentó una reducción significativa. En 1985 Hernández Jáuregui, et al administrando a ratones una dosis de 0.066% durante 15 días observaron una disminución en el peso de los testículos.

Los resultados obtenidos de los pesos testiculares en el momento de la oligospermia comparados con su testigo y con los pesos después de la recuperación confirman la reversibilidad del tratamiento con la dosis de 50 mg/Kg de peso de furazolidona, dado que durante el tratamiento los pesos testiculares se redujeron, y después del periodo de recuperación los pesos testiculares alcanzaron sus valores normales.

El estudio histológico de los túbulos seminíferos de los conejos sometidos al tratamiento de furazolidona, reveló que después del tratamiento la espermatogénesis se detuvo a nivel de espermatocito primario en la fase de paquiteno, encontrándose que dentro de los túbulos seminíferos no había espermatidas ni espermatozoides, las células de Leydig se encontraron normales tanto en morfología como en número. En 1977 Satoru, et al reportaron que la dosis de 400, 700 y 1000 p.p.m. en ratas

durante 30 días provocan una hipoplasia extrema del testículo con la ausencia de espermatozoides y espermatozoides en los túbulos seminíferos. Koeda, et al en 1977 reportan los mismos resultados en cobayos. Hernández Jáuregui et al, en 1982 encontraron que la espermatogénesis se detenía en la fase de espermatozoides primario en paquiteno en los gallos sometidos al tratamiento de 0.011% durante 2 meses y 0.022% durante 15 días de furazolidona. En 1984 Ali y Khogali encontraron que las dosis de 0.08 peso/peso, 40 y 80 mg de furazolidona por kg de peso corporal en gallos induce una atrofia a nivel de los túbulos seminíferos. Zermeño, et al en 1984 con una dosis de 0.04% durante 35 días en gallos encontró una disminución en la densidad espermática. En 1985 Hernández Jáuregui, et al demostraron que las dosis de 0.03% y 0.04% de furazolidona administrada durante un mes a ratones machos produce un retardo en la espermatogénesis a nivel de espermatozoides primario, con la dosis de 0.066% administrada durante 15 días reportaron que la espermatogénesis estaba detenida en la fase de espermatozoides primario en paquiteno con muy pocas espermáticas, lo que afectó la fertilidad de los machos.

Los estudios de Satoru, et al (1977) en ratas señalan que las dosis de 400, 700 y 1000 p.p.m. de furazolidona administrada durante 30 días provoca una atrofia con desnaturalización y disminución en el número de células de la mucosa gástrica, siendo los efectos más nocivos con las dosis de 700 y 1000 p.p.m. Koeda, et al (1977) administraron a cobayos dosis crecientes de

furazolidona de 200 a 1000 p.p.m. encontrando cambios semejantes a nivel de la mucosa gástrica. En las glándulas adrenales este autor reporta reducción a un tercio de su tamaño normal y atrofia de la corteza adrenal, sin embargo, en 1983 los resultados de Ali, et al mostraron que la dosis de 0.04% administrada en el alimento a pollos y cerdos durante 10 días produce un incremento en el peso de las glándulas adrenales debido a una hipertrofia de la corteza adrenal. Los estudios anteriores reportan una destrucción de la mucosa gástrica de los animales sometidos a diferentes tratamientos con furazolidona, sin embargo el estómago de los conejos sometidos a la dosis de 50 mg de furazolidona por kg. de peso no presentó ningún daño, de igual forma el intestino y el hígado no revelaron ninguna lesión, solamente en las glándulas adrenales del conejo 7 se encontró que la zona fascicular era corta y la zona glomerulosa no se observó, distinguiéndose una fibrosis en la superficie adrenal.

VIII CONCLUSIONES

- La administración de la dosis oral diaria de 50 mg de furazolidona por kg. de peso corporal induce en el conejo una oligospermia incompatible con la fertilidad a los seis meses de tratamiento siendo su efecto reversible tres meses después de suspendido el medicamento.
- El volumen del eyaculado de los conejos no fue afectado con el tratamiento.
- La motilidad de los espermatozoides en el eyaculado disminuyó significativamente a los 6 meses de iniciado el tratamiento y se recuperó 3 meses después de suspendida la administración.
- La densidad espermática disminuyó a los 6 meses de iniciado el tratamiento y 3 meses después de suspendido alcanzó los niveles normales.
- La mortalidad y malformaciones de los espermatozoides aumentaron significativamente a los 6 meses de iniciado el tratamiento, recuperando sus valores normales 3 meses después de suspendido el medicamento.
- Los niveles hormonales de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona no se alteraron a lo largo de todo el experimento.

-No se encontraron alteraciones histológicas en otros órganos, solo en las glándulas adrenales de uno de los conejos, lo cual no interfirió con su fertilidad.

-La conducta sexual en los animales no se alteró a lo largo del experimento.

-Los descendientes obtenidos después del periodo de recuperación fueron normales en número y estructura macroscópica dentro de las 24 horas posteriores al parto.

IX BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALBERT. P.S., MINIBERG, D.T. and DAVIS, J.E. 1975. Nitrofurans as sperm immobilising agents: their toxicity and their chemical application. Brit. J. Urol. (47):459-462
- 2.- ALI. B.H. 1983. Some pharmacological and toxicological properties of furazolidone. Vet. Res. Commun. (6):1-11
- 3.- ALI. B.H. 1983. The effect of furazolidone on the adrenal glands of the chicken. Vet. Quart. (5)4:190-192
- 4.- ALI. B.H., HOMEIDA, A.M and KNIFTON, A. 1983. The effect of furazolidone on fertility of male chickens. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 78C. No.1, 43-47
- 5.- ALI. B.H. and KHOGALI, A. 1984. Plasma and histological changes in furazolidone treated chickens. Res. Vet. Sci. (37):290-292
- 6.- BELLOF, G.B., BUZARD, J. and ROBERTS, H.D.B 1957. The effect of furazolidone. Consumption on drug content of chicken tissues and eggs, color of shell, yolk and whole eggs homogenate. Res. Vet.:223-227
- 7.- BUZARD. J.A., ELLS, V.R. and PAUL, M.F. 1956. Colorimetric determination of nitrofurazone and furazolidone in feed and premixes. Ass. Off. Agr. Chem. Vol.39, No.2:512-518
- 8.- BUZARD J.A., VRABLIC, D.M. and PAUL. M.F. 1956. Colorimetric determination of nitrofurazone, nitrofurantoin and furazolidone in plasma. Antib. Chem. (VI):No.12:702-707
- 9.- CALESNICK, B. 1958. Amer. J. Med. Sci. 236:736-746. Citado en So.
- 10.- CHATTERJEE. S.N., BANERJEE, S.K., PAL A.K. and TAYASRI

- BASAK.1983. DNA damage, prophage induction and mutation by furazolidone.Chem. Biol. Inter.(45):315-326
- 11.- CRAINE, M.E. and WILLIAMS, H.R. 1972. Metabolites of furazolidone in urine of chickens.Jour. Pharm. Sci.(61) 9:1495- 1497
- 12.- CZARNECKI, C.M. and JANKUS. E.F. 1975. Effect of furazolidone on heart weights and myocardial moisture content in turkey poults.Avi. Diss.(19)3:622-625
- 13.- CZARNECKI, C.M., REDIG, P.T. and DUNNETTE. J.L. 1983. Delayed-T cell maturation and suppression of mitogen-induced blastogenesis in turkey poults fed cortisone and acetate and furazolidone.Avi. Diss.(27)4:1051-1057
- 14.- CZARNECKI, C.M. and EVANSON. O.A. 1983. Myocardial calcium level in furazolidone-induced cardiomyopathy in turkey poults. Comp. Biochem. Physiol.(75C):207-209
- 14a.-DEAN, W.I., STEPHENSON, E.L.(1968). The influence of dietary furazolidone on egg production, hatchability, fertility and feed efficiency of laying and breeding hens.Poult. Sci.37:124.
- 15.- DODD, M.C. and STILLMAN. W.B. 1944. The in vitro bacteriostatic action of some simple furan derivatives. Jour. Pharmacol. Exper. Therap.(82):11
- 16.- FONATSCH, C. 1977. Effect of nitrofurantoin on meiosis of the male mouse.Hum. Genet.(39):345-351
- 17.- FRANCIS. D.W., SHAFFNER C.S. 1955. An investigation of the morphological changes in young chickens and reproductive performance of adult chickens fed furazolidone or

nitrofurazone. Poult. Sci. 34:1195

- 18.- FRIEDGOOD, C.E. and GREEN, M.N. 1950. The effect of nitrofurazone on growth of fibrosarcoma in mice. Cancer Res. (10):613
- 19.- FRIEDGOOD, C.E. and RIPSTEIN C.B. 1951. Effect of nitrofurazone on tumors of the human testis and prostate gland. Surg. Forum. (2):329-339
- 20.- GERSTMANN, P.E. and La VECK. G.D. 1963. Amer. J. Public Health. (53):266-273
- 21.- GOMEZ, W.R. 1970. Chemical agents affecting testicular function and male fertility. Academic Press. 483
- 22.- GREEN, M.N. and FRIEDGOOD, C.E. 1948. Action of furacin in delaying growth of transplanted fibrosarcoma in mice. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. (69):603-604
- 23.- GWATHMEY, J.K. 1984. The effect of digitalis or propranolol on furazolidone-induced cardiomyopathy in turkey poult. Dis. Abst. Int. (44)09:2605B
- 24.- HERNANDEZ, J. P., REVILLA. M.C., HERRERA, J. and J. BERMUDEZ. 1985 Effect of furazolidone on spermatogenesis in mice: A fertility and morpho-physiological correlation advances in contraceptive delivery systems, monograph II; 240-247
- 25.- HERNANDEZ, J.P., M.C. REVILLA y M.E. VELASCO. 1982. Estudio ultraestructural de la morfología del testículo de gallo después del tratamiento con furazolidona. Arch. Invest. Med. México. (14):1-8
- 26.- HOLLIFIELD, R.D.T. and CONKLIN, J.D. 1968. Jour. Pharm

- Sci. (57):325. Citado en 18
- 27.- HUOLLINGER, M.A. and DAVIS, S.R. 1970. In vivo nucleic acid. labelling in rat testis following nitrofurazone administration. Arch. Int. Pharm. (185):20
- 28.- JANKUS, E.F. et al. 1972. Furazolidone-induced cardiac dilatation in turkey. Avi. Diss. Res. Note. 958-961
- 29.- KOEDA, T. et al. 1977. Subacute toxicity of furazolidone for guinea pig after two months administration changes on adrenal glands, testis and stomach. Ann. Rep. Nat. Vet. Assay 14: 21-30
- 30.- KONDRÁ, P.A. and GUENTER, W. 1968. Effect of nitrofurazone and furazolidone on reproduction in chickens. Poult. Sci. (47):1642-1643
- 31.- LANDAIS, G.M., HEDTIS J.P., RONALD, PH.D, HERRET, J. and DIAZ, J.K. 1975. Non absorption of furazolidone from the vagina in women. Curr. Ther. Res. (18)3:510-512
- 32.- LANDAIS, G.M., HEDTIS, J.P., RONALD, PH.D., MERTZ, J.L. DIAZ, J.R and VAN HART, D.C. 1976. Non-absorption of nitrofurazone from the urethra in men. Curr. Ther. Res. (19)550-553
- 33.- McCALLA. D.R.. REUVERS, A. and KAISER. 1971. "Activation" of nitrofurazone in animal tissues. Biochim. Pharm. (20):3532-3537
- 34.- MUSGRAVE, M.E. and ARM, H.G. 1959. Anti. Med. Clin. Therapy. (7):17-20
- 35.- NELSDON, W.O. and STEINBERGER, E. 1953. Effect of nitrofurazone compounds on the testis of the rat. Fed. Proc. Am. Physiol. Soc. (12):103

- 36.- NELSON, W.O. and BUNGE, R.G. 1957. Effect of therapeutic dosage of nitrofurantoin (furadantin) upon spermatogenesis in man. J. Urol. (77):275-281
- 37.- NELSON, W.O. and PATANELLI, D.J. 1961. Atrophy of the testicle after nitrofurazone treatment. Fed. Proc. (20):418
- 38.- OAKBERG, E.F. 1957. Duration of spermatogenesis in the mouse. Nature (180):11497
- 39.- OLIVARD, J., S. VALENTI and J.A.J. BUZARD. 1962. Med. Pharm. Chem. (5):524. Citado en 33
- 40.- OMER, V.V., 1978. Efficacy and toxicity of furazolidone in veterinary medicine. Vet. Med/Sm. Anim. Clin. (73):1125-1132
- 41.- PAUL, H. E. 1952. Effect of furacin on the "in vitro" metabolism of the mammalian tissues. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79:555-558
- 42.- PAUL, H.E., ELLS, V.R. KOPKO, F. and BENDER, R.C. 1960. Metabolism of nitrofurans. Med. Pharm. Chem. (2):563
- 43.- PEGGY, L.O. and McCALLA, D.R. 1975. Damage to mammalian cells DNA by nitrofurans. Cancer Research (35):781-784
- 44.- PEGGY, L.O. and McCALLA, D.R. 1977. Cytotoxicity and DNA damage to mammalian cells by nitrofurans. Chem. Biol. Inter. (16):223-233
- 45.- PEGGY, L.O. 1978. Nitrofurazone-induced DNA damage to tissue of mice. Chem. Biol. Inter. 323-331
- 46.- PLAM, D. et al. 1967. Hemmung der monoamin oxydase durch bakteriostatisch wirksame nitrofurane derivate. Naun. Schm. Arch. Pharmak. Exp. Path. (256):281-300

- 47.- POLIAND, V.A., LEADBETTER, G.W. and LEADBETTER, W.F. 1958. Use of furacin in treatment of testicular tumors. A case report. J. Urol. (79):771-774
- 48.- POWERS, M.D. et al. 1983. Monoamine oxydase inhibition and furazolidone-induced cardiomyopathy in turkey poults. Poult. Science (62):1950-1955
- 49.- PRIOR, J.T. and FERGUSON, J.H. 1950. Cytotoxic effects of a nitrofurane on the rat testis. Cancer, (3):1062-1072
- 50.- SATORU KONNO, TETSUD KOEDA & HIROSHI FUJIWARA. 1977. Furazolidone-induced changes in rat testis, ovary and stomach of rats. Bull. Nat. Inst. Anim. Health. No. 74:30-38
- 51.- SIDDOV, I. and LUDERS, H. 1971. Untersuchungen des plasmacorticosteron spiegel von Koen nach orale applikation von furazolidon. Dent. Tierarztl. Wschr. (78):375-378
- 52.- STEINBERGER, E. and DUCHOTT, G.E. 1964. Effect of sex steroids on furadoxyl-induced damage to rat testis. Anat. Res. (148):340
- 53.- SWIERSTRA, E.E. and FOOTE, R.H. 1963. Duration of spermatogenesis and spermatozoa transport in the rabbit based on cytological changes, DNA syntesis and labeling with tritiated thymidine. Am. J. Anat. (116):401-412
- 54.- SZEZUKOWSKI, M.J., DAIWITT, A.L. and ELARICK, H. 1958. Metastatic testicular tumor treated with nitrofurazone. J.A.M.A. (167):1066-1068
- 55.- TATSUMI, et al. (1984). Metabolism "in vivo" of furazolidone. Evidence for formation of an open chain

- carboxylic acid and alfa-ketoglutaric acid from the nitrofurans in rats. Arch. Biochem. Biophys. 234(1):112-116
- 56.- TENNETH, D.M. and RAY, W.H. 1963. Fed. Proc. (22):367
- 57.- TENNETH, D.M. and RAY, W.H. 1971. Metabolism of furazolidone in swine. P.S.E.B.M. (138):808-810
- 58.- VAN VLEET, J.P. et al. 1982. Congestive cardiomyopathy induced in ducklings fed graded amounts of furazolidone. Am. J. Vet. Res. (44):76-85
- 59.- VILLANUEVA, S.T. 1982. Evaluación ultraestructural del efecto de la furazolidona sobre la meiosis en aves. Tesis de Lic. Fac. Med. Vet. Zoot. UNAM, México D.F.
- 60.- VILLASENOR, M.J. 1968. Consideraciones farmacológicas y aplicaciones de los nitrofuranos. Norwich Pharmacol of México. 82-90
- 61.- WILDERMUTH, G. 1955. Testicular cancer: Management of metastases. with report of a new chemotherapeutic agent. Radiology. (65):599-602
- 62.- YUNDA, I.F. and Y.I. KUSHNIROK. 1974. Effect of nitrofurans preparations on spermatogenesis. Bull. Exp. Biol. Med. (77):68-77
- 63.- ZAMARO, Q.M.A. et al. 1985. Efecto de la furazolidona sobre el semen de gallos. IX Congreso Latinoamericano de Avicultura. XXIV Congreso Nacional de Avicultura. X Convención Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Acapulco, Gro. 325-332

- 64.- ZERMEÑO, H.A. y PAASCH, H.L. 1984. Evaluación y cuantificación de las lesiones producidas en el testículo de aves reproductoras por la furazolidona a diferentes dosis. IX Congreso Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Guanajuato, Gto. 38-46
- 65.- ZERMEÑO, H.A. y PAASCH, H.L. 1984. Evaluación de las lesiones producidas en el testículo de gallos reproductores por la furazolidona. Vet. Méx. (15):263-266

A N E X O 1

METODO PARA LA DETERMINACION DE LA DENSIDAD ESPERMATICA

POR MILILITRO DE EYACULADO CON CAMARA DE NEUBAUER

Se hace una dilución 1:10 de la muestra de semen y se agita suavemente, se tiran las dos primeras gotas y una gota se deposita en la ranura de la cámara hasta que se llene completamente sin que se derrame. Utilizando el objetivo de 40x se localiza el cuadrículado en donde aparecen 25 cuadrantes subdivididos a su vez en 16 subcuadrantes (fig. 2). Se cuentan las células contenidas en los 4 cuadrantes de los extremos y en el central, considerando las células que están sobre las líneas que limitan hacia el interior. Cada conteo se hace por duplicado. El total de células contadas en los 5 cuadrantes corresponde a las contenidas en 1/5 del volumen cuya dilución es 1:10 μ l. Para obtener el número de células en 1.0 μ l se multiplica el número total por 50 000 y el número de células por mililitro se obtiene multiplicando este resultado por 10.

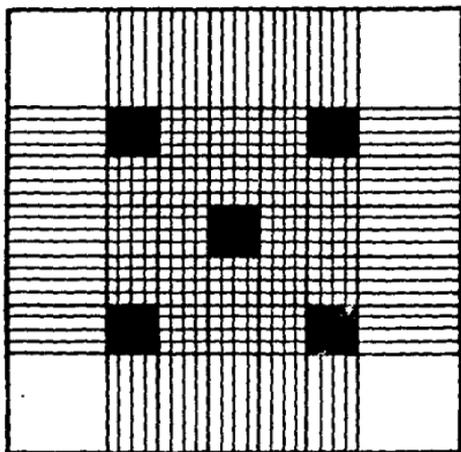


Fig. 2. CUADRICULADO DE UNA CAMARA DE NEUBAUER. EN LOS CUADROS SOMBREADOS SE CUENTAN LAS CELULAS.

A N E X O 2

METODO PARA LA DETERMINACION DE ANDROGENOS. TESTOSTERONA ANDRUSTENDIONA Y 5 α -DIHIDROTESTOSTERONA POR RADIOINMUNOANALISIS

La determinación cuantitativa de andrógeno consta de 4 etapas: preparación, extracción, separación y radioinmunoanálisis.

PREPARACION.- Se hace un protocolo en el que se describe el seguimiento de los pasos involucrados y los incidentes ocurridos durante el desarrollo. Se hace una lista en numeración corrida de los números de trabajo, los cuales tendrán al final una correspondencia a la clave o identificación de la muestra. Se hacen lotes de 8 muestras numeradas del 2 al 9 y el 0 y 1 se tienen como blancos.

Una vez que se preparó el protocolo, en tubos de centrifuga con tapón (de vidrio, fondo cónico y de 15 ml. de capacidad) se colocan 10 μ l de soluciones etanólicas de cada uno de los esteróides a determinar, en los cuales se tienen aproximadamente 1000 cuentas por minuto (cpm), se colocan en viáles y por separado idénticas alícuotas, que servirán como controles en la evaluación de pérdidas de material durante los procedimientos posteriores. Después de la colocación de los trazadores se agrega a la muestra 1 ml. de suero de conejo y se agita durante 5 segundos para asegurar la incorporación de los trazadores con los componentes del suero.

EXTRACCION.- Ya que los esteróides están disueltos en el suero sanguíneo se tienen que extraer. En el tubo de extracción ya

preparado se agregan 5 ml. de éter dietílico (se pone el tapón de vidrio) y se agita por vibración sin mojar el tapón durante un minuto, después se deja reposar para que se separen las fases. la fase acuosa más densa queda bajo la fase orgánica. La fase acuosa se congela colocando los tubos en un baño de acetona con hielo seco. La fase orgánica es decantada a tubos de centrifuga sin tapón, se deja evaporar a una presión se 0.1 atm. Una vez que se tienen secos los esteróides se procede a su separación.

SEPARACION.- Para la separación de los esteróides se empleó la cromatografía en placa delgada de sílica gel. Se utilizaron cromatoplasas de sílica gel G.60 F .254 con espesor de 0.25 mm. sobre un soporte de vidrio de 20 x 20. En un lado de la cromatoplasa se marca con un lápiz una línea a 2 cm. del borde que servirán de origen para el sistema. Sobre esta línea se marcan 10 líneas de un cm. de longitud separadas entre si a 0.5 cm., procurando que queden en el centro de la placa. Hacia los extremos de la placa a 2 cm. de las muestras y a 1.5 cm. del borde lateral se marcan las zonas de los estándares cromatográficos. Con un lápiz se marca bajo cada zona de un cm. el número de tubo correspondiente, de tal forma que el primero y el último serán los blancos y las muestras se tendrán al centro de la cromatoplasa. Se hace la transferencia del extracto etéreo a la correspondiente zona de aplicación, primero se agregan 6-7 gotas de una mezcla de éter dietílico-metanol 9:1 sobre las paredes del tubo para que se concentre el extracto. El extracto disuelto se transfiere con una pipeta Pasteur con la punta

adelgazada hasta un capilar, de manera que la solución sea absorbida por la sílica sin romper la superficie de ésta; la zona de aplicación no debe exceder más de 2 mm. de la línea de origen. Después de aplicada toda la mezcla, se vuelve a lavar el tubo 2 veces más con 4-5 gotas de la mezcla de éter dietílico-metanol y se hace la transferencia a la placa con toda precaución. Cuando se tienen los extractos en las áreas de aplicación de la cromatoplaque, se agregan los estándares de cromatografía cuya concentración es de 1 mg/ml. con una jeringa Hamilton de 2 mm. de diámetro con el centro en la línea de origen, a cada lado de la cromatoplaque se agregan 2 µl de las soluciones de esteroides auténticos. Los estándares se emplean para localizar e identificar las áreas de desarrollo de cada esteroide. Las cromatoplaques se colocan en las cámaras con los disolventes para el desarrollo y separación de los esteroides. Las líneas de origen hacia abajo y la superficie con la sílica hacia el centro y recargada sobre la pared de la cámara que contiene aproximadamente 100 ml. de benceno puro, las cámaras se tapan y se ponen unas pesas encima para que no se pierdan los vapores. Este primer sistema mueve los esteroides de polaridad menor aproximadamente 5-10 mm. y a otros de polaridad mayor como el colesterol y ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados por lo que limpia la muestra de posibles interferencias de otros componentes naturales del suero. El disolvente se deja llegar hasta el borde superior (90-120 min.), se destapan las cámaras y con cuidado sin tocar la sílica se sacan las placas y se dejan secar sobre la

mesa hasta que se evapore todo el disolvente, las cámaras se vacían y se secan con ayuda de un ventilador de mano. Se le agrega a la cámara una solución de benceno-acetato de etilo 7:3, las cromatoplacas completamente evaporado el benceno se vuelven a introducir a la cámara con mucho cuidado y se tapan, se deja que el disolvente llegue hasta el borde y se vuelve a sacar la cromatoplaca para que se evaporen los disolventes y se coloca en otro sistema con una solución de benceno-metanol 9:1. Los sistemas empleados tienen una polaridad creciente, el resultado de los sistemas cromatográficos se revela colocando la cromatoplaca a la luz ultravioleta de 250 nm; el componente F.254 presente en la cromatoplaca hace aparecer en la sílica una fluorescencia verdosa, en los sitios donde existe un componente con capacidad de absorber esta longitud de onda, impedirá que ésta luz llegue al componente fluorescente y será observado como una zona morada o violeta. La luz ultravioleta de 250 nm es absorbida por los sistemas de doble enlace conjugados de carbono o bien por los sistemas α ceto insaturados por lo que los esteroides de la serie Δ^{4-3} cetona pueden absorber esta longitud de onda; la Testorena y la Androstendiona tienen el sistema Δ^{4-3} cetona en su estructura por lo que los 2 μ g de esteroides se observan fácilmente sobre el fondo verdoso de la cromatoplaca. Con un lápiz se marcan los contornos de las áreas de desarrollo de los estándares de la cromatoplaca. La 5 α -Dihidrotestosterona no absorbe la luz ultravioleta por lo que se revela por la formación de un compuesto colorido con la reacción de Zimmerman,

en la cual se agrega metadihidrobenceno en medio alcalino con una pipeta Pasteur en línea recta de tal forma que una las áreas reveladas de Testosterona y Androstendiona, se calienta con una pistola de aire y la Dihidrotestosterona reacciona formando una línea de color rosado que cambia a morado, se marcan los límites superior e inferior. Revelados los esteroides se marcan los límites superiores e inferiores de los estándares y de las muestras los límites izquierdo y derecho dibujando un cuadrado donde se tienen las zonas de desarrollo de los esteroides. En esta zona se raspa la sílica en la cual se tienen los esteroides adsorbidos, el polvo y los fragmentos se absorben mediante vacío en una pipeta Pasteur empacada con fibra de vidrio, formándose una columna que contiene solo uno de los esteroides, así se hace para cada uno de los esteroides a determinar. Los esteroides en las columnas de cada pipeta son eluidos con 1.2 ml. de una mezcla de éter dietílico-metanol 9:1, hacia tubos de vidrio de 10x15 en los que se colectan 1050 a 1100 μ l., la elución se hace rápidamente en grupos de 10 tubos los cuales se agitan con el vibrador 1-2 segundos sin derramar el líquido; se toman alícuotas iguales de 500 μ l., la primera se coloca en tubos de ensayo de 10x75 mm. y la segunda en viales de conteo marcados con el código de muestra y esteroide correspondiente. Las dos alícuotas se evaporan a sequedad. la de los tubos para radioinmunoanálisis y la de los viales es para la evaluación de las pérdidas de material radiactivo agregado en la etapa de preparación; a estos viales de recuperación y los controles correspondientes se les

añade 5 ml. de líquido de centelleo Fluor(Tolueno-PP0-POPOP), se tapan y se agitan suavemente, se evalúa el contenido de radiactividad en cada vial contando los centelleos en un espectrofotómetro de centelleo Packard 3390, durante periodos de 10 minutos.

RADIODINMUNOANALISIS.- La determinación cuantitativa por radioinmunoanálisis se basa en el análisis por saturación en el que una molécula P muestra tener capacidad de unirse a S con cierta afinidad; la molécula P en determinada concentración es saturada con una población S* y si se coloca en un medio con diversas concentraciones de S podrán formarse dos tipos de complejos PS y PS*, dado que la unión de P y S o P y S* no es definitiva se establecerá un equilibrio entre ambos complejos; pero, la proporción de cada uno de ellos dependerá de las concentraciones relativas de S y S* en el radioinmunoanálisis P es un anticuerpo y S un esteroide pero marcado radiactivamente ^{3H}. En tubos de ensaye de vidrio de 10x75 mm. marcados como curva, se agregan cantidades de 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, y 50000 pg de un esteroide Androstendiona, Testosterona o Dihidrotestosterona, tomando alícuotas por triplicado de soluciones etanólicas de concentración conocida, el disolvente se evapora a sequedad. Se evapora una solución S* en cantidad suficiente para dar 5000 cpm en cada 500 μ l. de la solución (solución amortiguador de fosfatos 0.15 M con 0.1% de galactosa y 0.1% de azida de sodio), a la cual se le agrega el suero del conejo que contiene los anticuerpos antiesteroide

especifico (Testosterona 1:10000; Androstendiona 1:7:500 y Dihidrotestosterona 1:10000). De esta mezcla se agregan 500 μ l de cada tubo de muestra y se dejan en incubación a 40°C durante 18-20 horas, tiempo en el cual se establece el equilibrio. Para separar S y S* libres se agregan 200 μ l. de una suspensión de carbón activado y dextran T-70 (625-62.5 mg%), se agita y se hace sedimentar las partículas de carbón por centrifugación a 1500 g durante 10 minutos a 40°C. Los complejos PS y PS* quedan en el sobrenadante mientras que las partículas S y S* se decantan a viales de conteo, a los que se agregan 5 ml de líquido de centelleo Instagel, se tapan y se agitan vigorosamente, el Instagel se agrega por la dificultad de evaporar 100 ml. de agua y también porque tiene un detergente por lo que es capaz de formar una sola fase, lo que hace posible el conteo de la radiactividad. El conteo se hace tanto en la curva como en las muestras. Con los datos de la curva se calcula el porcentaje de unión neta tomando como el 100% la cantidad de cuentas de esteróide radiactivo o unido a la dosis de 0 pg. de esteróide no radiactivo y después de restar la llamada unión inespecifica (las cuentas obtenidas en los tubos de 50000 pg. un exceso de masa que debería desplazar todo el esteróide radiactivo unido). Así a cada punto de la curva se le calcula su porcentaje de unión neta el cual se expresa en su transformación Log_et como función del log de la cantidad de masa agregada para que nos dé una recta de pendiente negativa de la que se calcula su ecuación. Ya sea manual o mecánicamente los porcentajes de unión neta de cada

muestra se interpolan a la curva patrón obteniendo así la respectiva cantidad de masa. Dado que al final de la etapa de separación se tomaron dos alícuotas iguales, la cantidad de trazador recuperado expresado como 100% del total agregado al inicio, es equivalente a la masa del esteróide inicial, conociendo la alícuota de muestra tomada, la cantidad de esteróide inicial se transforma en términos de concentración pg/ml de cada esteróide y cada muestra.